



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYLA DAIANE CORRÊA MOLINARI

**OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE SOJA
CONTENDO A CONSTRUÇÃO 35S:A₁NCED3 VISANDO
TOLERÂNCIA A SECA**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE
SOJA CONTENDO A CONSTRUÇÃO 35S:A α NCED3 VISANDO
TOLERÂNCIA A SECA**

MAYLA DAIANE CORRÊA MOLINARI

**OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE SOJA
CONTENDO A CONSTRUÇÃO 35S:A α NCED3 VISANDO
TOLERÂNCIA A 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
Co-orientadora: Dra. Renata Fuganti-Pagliarini

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M722o Molinari, Mayla Daiane Corrêa.
Obtenção e análise molecular e fisiológica de soja contendo a construção gênica
35S:AtNCED3 visando tolerância a seca / Mayla Daiane Corrêa Molinari. – Londrina, 2015.
86 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Coorientador: Renata Fuganti-Pagliarini.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Déficit hídrico – Teses. 3. Plantas – Resistência
a seca – Teses. 4. Plantas transgênicas – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Fuganti-
Pagliarini, Renata. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agronômico do Paraná.
V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.34

MAYLA DAIANE CORRÊA MOLINARI

**OBTENÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR E FISIOLÓGIA DE SOJA
CONTENDO A CONTRUÇÃO GÊNICA 35S:AtNCED3 VISANDO
TOLERÂNCIA A 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.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA – Soja/ UEL

Dr. José Renato Bouças Farias
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMBRAPA - Soja

Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Londrina, 26 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Hugo e Leny, que estão ao meu lado independentemente de minhas escolhas, apoiando-me e viabilizando minha caminhada;

À minha maravilhosa filhinha, Manuela, por ter vindo para me ensinar a ser uma pessoa melhor e me apoiar em todos os momentos. Mamãe te ama.

Aos meus irmãos Hugo e Meire, com quem posso contar em qualquer situação;

Agradeço ainda à Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja por me proporcionarem o espaço, a experiência e as condições necessárias para a realização deste trabalho;

À CAPES pelo suporte financeiro;

Ao JIRCAS e demais parcerias japonesas, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e contribuir nesse amplo ramo da genética vegetal;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos científicos;

À minha amiga e co-orientadora Dra. Renata Fuganti Pagliarini, pelas correções, amizade e gentileza em sempre estar disposta a ajudar;

À minha amiga MSc. Silvana Regina Rockenbach Marin, que tanto me ajudou possibilitando que este trabalho fosse feito, sem ela não seria possível;

Ao Dr. Leonardo Cesar Ferreira pelas correções e prontidão em sempre estar disponível para ajudar;

Aos meus amigos Raiza, Danilo, Isabela pela maravilhosa amizade e apoio eterno. Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, principalmente a Rafaela, Talitta e Carla que tanto me ajudaram.

À Dra. Ana Lúcia Dias, Maria Sueli e demais pela estrutura administrativa do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL, pela boa vontade e auxílio e;

Todos os professores que conheci nessa jornada, obrigado pelos ensinamentos.

“ALEA JACTA EST”

Júlio César

MOLINARI, Mayla Daiane Corrêa. **Obtenção e análise molecular e fisiológica de soja contendo a construção 35S:AtNCED3 visando tolerância a seca.** 2015. 89 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

RESUMO

Nos últimos anos, a demanda por soja tem aumentado significativamente em razão da sua utilização na produção de ração animal, biodiesel e também da sua inclusão na dieta humana. A produção deste grão, no entanto, sofrerá prejuízos de acordo com as previsões futuras que indicam que o aumento da temperatura irá alterar o regime de chuvas, de demanda evaporativa da atmosfera, e conseqüentemente da transpiração das plantas, resultando em um maior consumo de água. Neste contexto de mudanças climáticas severas, estratégias de engenharia genética como o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) com genes que conferem tolerância à estresses abióticos como a seca tornam-se imprescindíveis a fim de auxiliar na mitigação de perdas de produção e produtividade. Sob condições de déficit hídrico, ocorre aumento dos níveis do fitormônio ácido abscísico (ABA) auxiliando a sobrevivência da planta. Sabe-se que na via biossintética do ABA a enzima *NCED3* catalisa um passo regulatório importante, clivando compostos precursores do fitormônio. Assim, o objetivo do presente estudo foi transformar a cultivar convencional de soja BRS 184 com a construção *35S:AtNCED3* e caracterizar os eventos obtidos fisiológica e molecularmente sob déficit hídrico (DH) em condições de casa de vegetação. A cultivar BR 16 foi utilizada como padrão de suscetibilidade ao déficit hídrico. O protocolo de transformação utilizado apresentou uma eficiência de 1,1% gerando dois eventos positivos (2Ha 11; 2Ha 13). Somente o evento 2Ha 11 transmitiu o transgene para geração T₂ apresentando padrão de segregação mendeliana. Os valores de trocas gasosas foram menores nos eventos transgênicos sob déficit hídrico (DH), resultando em uma eficiência do uso água 223% maior nestas plantas quando comparadas a cultivar BRS 184. A massa seca total (MST) do evento 2Ha 11 apresentou-se maior que a das cultivares BRS 184 e BR 16. Na condição controle, o evento 2Ha 11 absorveu 27% mais água que sua isolinha (BRS184), preservando água no solo. Foi verificado também que apesar do evento 2Ha 11 apresentar menor altura, a TCRalt foi semelhante BRS184 e a TCRg/dia foi superior a sua isolinha. Este evento apresentou ainda NTS e NVCS 40% superiores quando comparados a sua isolinha. Os dados moleculares mostraram maiores níveis de expressão dos genes *AtNCED3*, *GmAAO3*, *GmPP2C*, *GmSnRK2* e *GmAREB1* nos eventos transgênicos sob DH. Os resultados sugerem que o evento 2Ha11 utilizou a estratégia de tolerância à seca, em função dos menores valores de trocas gasosas, armazenando maior volume de água no substrato sob DH. Tal mecanismo pode estar associado ao aumento das concentrações de ABA em função da maior expressão do gene *AtNCED3*.

Palavras-chave: Déficit hídrico. ABA-dependente. 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenase. *Glycine max* L. Merrill.

MOLINARI, Mayla Daiane Corrêa. **Molecular and physiological analysis of soybeans containing 35S:AtNCED3 with the aim of improving drought tolerance.** 2015. 89 p. Dissertation (MSc in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, 2015.

ABSTRACT

In recent years, the demand for soybean has increased significantly due to its use in the production of animal feed, biodiesel and its inclusion in the human diet. However, the production of this grain will suffer losses in accordance with future forecasts that indicate the increasing temperature will change rainfall, atmospheric evaporative demand and consequently plant transpiration, resulting in a greater water consumption. In this context of severe climate change, genetic engineering strategies – such as the development of genetic modified crops (GMCs) with genes that confer tolerance to abiotic stresses (e.g. drought) – become indispensable in order to mitigate production and productivity losses. Under water deficit, abscisic acid (ABA) level increases helping plant survival. It is known that in the biosynthetic pathway of ABA, the *NCED3* enzyme catalyzes an important regulatory step, cleaving precursors compounds of this phytohormone. Thus, the aim of this study was to transform the conventional soybean cultivar BRS 184 with the construction 35S:AtNCED3 and characterize the events obtained physiologically and molecularly under water deficit (WD) in greenhouse conditions. Cultivar BR 16 was used as standard for susceptibility to water deficit. The transformation protocol presented an efficiency of 1.1%, generating two positive events (2Ha 11; 2Ha 13). Only event 2Ha 11 transmitted the transgene to generation T₂, according to Mendelian inheritance patterns. The values of gas exchange were lower in transgenic events under water deficit (WD), resulting in a water use efficiency 223% higher in these plants when compared to cultivar BRS 184. Total dry matter (TDM) of event 2Ha 11 was higher than cultivars BRS 184 and BR 16. Under control conditions event 2Ha 11 absorbed 27% more water than its isoline (BRS 184), preserving water in the soil. It was also verified that event 2Ha 11 showed lower height, TCRalt similar to it isoline, while TCRg/day was higher than it. This event also presented NTS and NVCS 40% superior than its isoline. Molecular data showed higher levels of *AtNCED3*, *GmAAO3*, *GmPP2C*, *GmSnRK2* and *GmAREB1* genes expression in the transgenic events under WD. Results suggest that, given its lower values of gas exchange, event 2Ha11 used drought tolerance strategy: storing more water in the substrate for under water deficit. Such mechanism can be associated with increased ABA concentrations, due to the increased expression of gene *AtNCED3*.

Keywords: Water deficit. ABA-dependent. 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase. *Glycine max* L. Merrill.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Área, produção e produtividade da soja nos anos safra 2009/10 a 2014/15 (CONAB, 2014; EMBRAPA, 2014; CONAB, 2015) 6
- Figura 2.** Produção total de grãos por cultura. Legenda: (*) Amendoim total, girassol, mamona, sorgo, aveia, canola, centeio e triticale. Fonte: CONAB. Nota: Estimativa em Janeiro de 20157
- Figura 3.** Produtos gênicos envolvidos na tolerância ao estresse. Os produtos dos genes são classificados em dois grupos. O primeiro inclui as proteínas funcionais e o segundo grupo contém as proteínas regulatórias. Adaptado de SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, (2007)12
- Figura 4.** Características fisiológicas e anatômicas associadas às respostas vegetais ao déficit hídrico em soja. Escape: as plantas adotam uma estratégia de “fuga” apresentando rápido desenvolvimento fenológico (VERSLUES et al., 2006). Evasão: envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula durante períodos de deficiência hídrica. Tolerância: envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula durante períodos de deficiência hídrica (MANAVALAN et al., 2009, adaptado pelo autor) 16
- Figura 5.** Redes regulatórias de transcrição de respostas ao estresse abiótico e expressão gênica. O esquema ilustra as vias dependentes e independentes de ABA, a ativação de genes e os sinais de transdução em resposta à seca, alta salinidade e frio. (Modificado a partir de SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007, adaptado pelo autor)..... 19
- Figura 6.** Visão de sensoriamento, sinalização e transporte de ABA. Os componentes relacionados com ABA são PYR/PYL/RCAR, PP2C e SnRK2 que formam um complexo de sinalização no núcleo, regulando diretamente a expressão dos genes dependentes de ABA por fosforilação de fatores de transcrição AREB/ABF. Por sua vez, no citoplasma, o complexo do núcleo

pode sair da membrana plasmática e fosforilar canais de ânions (SLAC1) ou canais de potássio (KAT1) para induzir o fechamento dos estômatos em resposta ao ABA. O cloroplasto também possui receptores de ABA em sua membrana, respondendo também em condições de déficit hídrico. O nível de ABA endógeno é um dos principais determinantes do sensoriamento mantido pela biossíntese, catabolismo ou transporte do ABA. Os movimentos de ABA são indicados pelas setas vermelhas (UMEZAWA et al., 2010, adaptado pelo autor)..... 21

Figura 7. Via de Sinalização ABA dependente. a) Quando ABA está ausente, a fosfatase PP2C fica livre para inibir a autofosforilação da família de quinases SnRKs. b) Neste caso, ABA está presente, permitindo que a família de proteínas PYR/PYL/RCAR se ligue e sequestre a fosfatase, que se desliga das quinases. Conseqüentemente, a quinase não é mais inibida pela fosfatase, e assim se auto-ativa e pode então fosforilar e ativar fatores de transcrição *downstream* (AREB/ABF) e iniciar a transcrição nos elementos promotores ABA-responsivos (AREBs) (SHEARD; ZHENG, 2009, adaptado pelo autor)..... 22

Figura 8. Rotas biossintéticas de ABA. a) Rota MVA (ácido mevalônico). Geralmente encontrada em fungos, é considerada a via direta, derivada do acetil-CoA, gerando seu produto final ABA. b) Rota MEP (metileritriol fosfato), considerada a via indireta, na qual o ABA é sintetizado a partir de um composto intermediário denominado xantoxina (SEO; KOSHIBA, 2002, adaptado pelo autor)24

Figura 9. Síntese e clivagem de carotenóides nos plastídios e a biossíntese de ABA no citoplasma vegetal. A conversão inicia-se no cloroplasto, onde ocorre a conversão da cis-violaxantina e trans-neoaxantina em cis-neolaxantina. Em seguida, a enzima NCED converte estas duas moléculas em xantoxina. No citoplasma, a xantoxina é convertida em ABA-aldeído, que por

fim será convertido em ABA pela enzima AAO3. (NAMBARA; MARION, 2005 adaptado pelo autor)..... 25

CAPÍTULO 2

- Figura 10.** Trocas de meios de cultura, onde 1 e 2 SL1 (meio de multibrotamento sem agente seletivo); 3 SI2 (meio de multibrotamento com agente seletivo glifosato); 4 meio de alongamento e enraizamento); 5 copos plásticos contendo substrato composto por areia:vermiculita (1:1) 51
- Figura 11.** PCR convencional dos eventos T₁ de soja identificadas como positivas para a construção gênica 35S:AtNCED3. As amostras foram amplificadas com dois pares de *primers* para confirmação dos eventos positivos (o par/ de *primer NCED3* que se anela nas extremidades do gene exógeno amplificando-o integralmente (1813 pb) e o par de *primer GUS* que se anela na região intron-GUS presente na construção gênica inserida que amplifica um fragmento de 976 pb. Legendas: 2Ha 11; 2Ha 13 (eventos transgênicos T₁ 35S:AtNCED3); Branco; BRS 184 (controle negativo); *pNCED* (plasmídio contendo o transgene AtNCED3) utilizado como controle positivo; *ladder* 1 Kb Plus (1% de agarose) 62
- Figura 12.** Trocas gasosas das plantas de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico e irrigação contínua (controle). **A.** Taxa fotossintética (*A*), Taxa transpiratória (*E*) (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); **B.** Condutância estomática (*Gs*) (mol H₂O m⁻² s⁻¹), Concentração intracelular de CO₂ (*Ci*) (μmol CO₂ mol⁻¹); **C.** Eficiência intrínseca do uso de água (*A/gs*). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (*p*≤0.05). Valores representam médias ± erro padrão de nove blocos.....65

- Figura 13.** Avaliação do substrato dos vasos de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico e irrigação (controle). O parâmetro avaliado foi a Umidade gravimétrica do solo (UG). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de seis blocos.66
- Figura 14.** Parâmetros de crescimento: **A.** Taxa de crescimento (TCRg/dia), **B.** Taxa de crescimento relativo em altura (TCRalt) **C.** Massas secas: Massa seca da raiz (MSR), Massa seca foliar (MSF), Massa seca de caules mais pecíolos (MSC), Massa seca total (MST). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de doze blocos. Legenda: * não houve interação genótipo e condição hídrica67
- Figura 15.** Parâmetros de rendimento das plantas de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico e irrigação. Os parâmetros avaliados foram: **A.** Número de sementes por vagem (NSV); Matéria seca total de sementes (MSTS); Peso de mil sementes (P1000); **B.** Número de vagens com sementes (NVCS); Número de vagens sem sementes (NVSS); Número total de sementes (NTS). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de nove blocos. Legenda: * não houve interação genótipo e condição hídrica69

Figura 16. Expressão gênica relativa do transgene *AtNCED3* e dos genes endógenos *GmNCED3*; *GmAAO3*; *GmPP2C*; *GmSnRK2*; *GmAREB1* no evento GM 2Ha 11 e nas cultivares convencionais de soja BRS 184 e BR 16. Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste T ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de nove blocos70

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1.	Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR para confirmação de eventos positivos	52
Tabela 2.	Sequências de <i>primers</i> dos genes <i>AtNCED3</i> , <i>GmAAO3</i> , <i>GmAREB1</i> , <i>GmSnRK2</i> , <i>GmPP2C</i> e <i>Gmβ-actina</i> utilizados para análise de expressão gênica relativa por RT-PCR	55
Tabela 3.	Sequências de <i>primers</i> dos genes <i>AtNCED3</i> , e <i>GmLectina</i> utilizados para análise de expressão gênica absoluta por RT-qPCR	57
Tabela 4.	Gerações T ₀ e T ₁ 35S: <i>AtNCED3</i> . O evento 2Ha 11 gerou as plantas 02, 03, 04, 05 e 06, e o evento 2Ha 13 gerou as plantas 51 e 52.....	62
Tabela 5.	Taxa de segregação na geração T ₂ para a construção 35S: <i>AtNCED3</i> com X ² (p≤0.05). S: Sim. N: Não.....	63
Tabela 6.	Parâmetros de Crescimento: Número de nós (NNOS); Comprimento médio interno (CMI); Altura (ALT); Área foliar (AF). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (p≤0.05). Valores representam médias ± erro padrão de doze blocos.....	68

LISTA DE SIGLAS

A	Taxa Fotossintética
AAO3	Ácido Abscisico oxidase 3
ABA	Ácido Abscisico
ABF	Fatores de ligação ao ABRE
ABRE	Elemento responsivo de ABA
AF	Área Foliar
ALT	Altura
AREB	Elemento de ligação de resposta ao ABA
CA	Forma Constitutivamente Ativa
Ci	Concentração intercelular de CO ₂
CNPTIA	Embrapa Informática Agropecuária
DH	Déficit Hídrico
DREB	Elemento de ligação de resposta à desidratação
E	Taxa Transpiratória
FPP	Farnesilpirofosfato
FT	Fatores de Transcrição
GM	Geneticamente Modificada
GS	Condutância Estomática
KAT1	Canais de Potássio
LEA	Abundantes na Embriogênese Tardia
MEP	Metileritritol Fosfato
MKK	MPK Quinase
MSC	Massa Seca de Caules e Pecíolos
MSF	Massa Seca Foliar
MSR	Massa Seca de Raiz
MST	Massa Total Seca
MSTS, g	Massa Seca Total de Sementes
MVA	Ácido Mevalônico
MYB	Mieloblastose oncogene
MYC	Mielocitomatose oncogene
NAC	Nam Ataf CUC2

NADPH-oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato-oxidase
NCED	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenase
NNOS	Número de Nós
NST	Número Total de Sementes
NSV	Número Total de Sementes por Vagem
NVCS	Número de vagens com sementes por planta
NVSS	Número de vagens sem sementes por planta
PB	Pares de Base
PGM	Plantas Geneticamente Modificadas
PP2Cs	Proteína Fosfatase tipo 2Cs
PYR	<i>Pyrabactin Resistance</i>
P1000, g	Peso de Mil Sementes
RCAR	Regulamentação do Receptor de ABA
RR	<i>Roundup Ready</i> [®]
SDR	Desidrogenase/ Redutase de cadeia curta
SLAC1	Canais de ânion
SnRK2	Proteína Quinase tipo 2 SNF-Relacionadas
TCR	Taxa de Crescimento Relativo
UG	Umidade Gravimétrica
UTR	<i>Untranslated Region</i>
ZEP	Zeaxantina Epoxidase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Soja e estresses abióticos	5
2.2	Uso de fatores de transcrição no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes ao déficit hídrico	12
2.3	Uso de genes de vias metabólicas no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes ao déficit hídrico	16
2.4	Via biossintética do ABA	23
2.5	NCED (<i>9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase</i>) e o déficit hídrico	26
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos	32
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO 2

5	ARTIGO	45
5.1	Introdução	46
5.2	Material e Métodos	48
5.2.1	Obtenção do cassete de expressão	48
5.2.2	Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para transformação	48
5.2.2.1	Material vegetal e infecção dos explantes	49
5.2.2.2	Regeneração e seleção	49
5.2.2.3	Identificação das plantas geneticamente modificadas com a construção <i>35S:AtNCED3</i>	51
5.2.3	Análise de segregação do transgene	53
5.2.4	Quantificação da expressão relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	53
5.2.4.1	Extração de RNA Total	53
5.2.4.2	Tratamento com DNase	54

5.2.4.3	Síntese de cDNA.....	55
5.2.4.4	Desenho de <i>primers</i> para técnica de RT-qPCR	55
5.2.5	Quantificação absoluta do número de cópias do transgene <i>AtNCED3</i> utilizando o método $2^{-\Delta Ct/2}$	57
5.2.6	Experimentos para avaliação molecular e fisiológica das PGMs contendo a construção 35S: <i>AtNCED3</i>	57
5.2.6.1	Delineamento e montagem dos experimentos – procedimento padrão.	57
5.2.6.2	Experimento para análise molecular e trocas gasosas	59
5.2.6.3	Experimento para parâmetros de rendimento	60
5.2.6.4	Experimento para análise de crescimento	60
5.2.7	Análise estatística.....	61
5.3	Resultados	62
5.3.1	Identificação de eventos positivos para o gene <i>AtNCED3</i>	62
5.3.2	Análise de Segregação dos transgenes e número de cópias.....	63
5.3.3	Análises fisiológicas e moleculares em plantas GMs e cultivares convencionais em condições de déficit hídrico	63
5.4	Discussão.....	71
5.5	Conclusões	80
5.6	Referências Bibliográficas	81

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento da demanda por soja tem incentivado o aumento da produção global da cultura (FRIEDMAN; BRANDON, 2001). O consumo de produtos à base de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] foi incorporado na dieta de grande parte da população mundial e tem aumentado significativamente em razão dos seus efeitos benéficos para a saúde (FRIEDMAN; BRANDON, 2001). O grão é considerado fonte de proteínas, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (SAKAI; KOGISO, 2008; EMBRAPA, 2014). A soja é ainda muito utilizada na produção de ração animal, e vem mais recentemente sendo utilizada para produção de biodiesel (MAPA, 2014).

Apesar de não ser uma espécie nativa, a soja está bem adaptada ao clima brasileiro, apresentando uma alta produtividade e colocando nosso país como segundo maior produtor mundial. O histórico nacional da sojicultura mostra valores crescentes de produção de grãos, embora ocorram quedas significativas em anos prejudicados pelo clima adverso. No Brasil, principalmente na região sul do país, somente na safra de 2004/2005, as perdas de rendimento de grãos nos estados do Rio Grande do Sul (RS) e do Paraná (PR) atingiram mais de 78% e 23%, respectivamente, sendo esta região responsável por mais de 80% das perdas totais. Mais recentemente, na safra 2013/2014, secas provocaram perdas em todo o país, embora houve estimativas de produção de 85.656 mil toneladas. No PR, o clima, reduziu a colheita em 2 milhões de toneladas. No RS, a má distribuição das chuvas ao longo do ciclo produtivo reduziu em 4% os níveis de produtividade. Em Minas Gerais (MG), a estiagem associada a elevadas temperaturas reduziu a produção em 10,7%. Em São Paulo (SP), as adversidades climáticas provocaram redução de 30,2% na produtividade (CONAB, 2014). Em números, os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico nos últimos anos (safra 2003/2004 a 2012/2013) alcançam a cifra de US\$ 46,6 bilhões¹.

Para o futuro próximo, as projeções sugerem que o aumento da temperatura média provocará mudanças climáticas em todo o planeta e, em

¹ Comunicação pessoal: Dr. José Renato Bouças Farias.

consequência, secas mais severas e prolongadas e/ou chuvas mais intensas ocorrerão em maior frequência (INPE, 2014). O aquecimento global poderá provocar uma mudança significativa no mapa da agricultura brasileira, gerando uma redução de áreas produtoras e prejuízos econômicos de cerca de R\$ 7,4 bilhões em 2020 e de R\$ 14 bilhões em 2070 (ASSAD; PINTO, 2008). Considerando este cenário futuro, o desenvolvimento de plantas mais tolerantes às adversidades climáticas, como a seca, tem sido alvo cada vez mais frequente de pesquisas científicas. Neste contexto, a biotecnologia apresenta-se como mais uma ferramenta viável e acessível para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) (BARBOSA et al., 2012).

Dentre os genes candidatos, na via de biossíntese do ABA, o gene *NCED* (9-cis-epóxicarotenóide dioxigenase) codifica uma enzima chave na regulação da via (IUCHI et al., 2001; BEHNAM et al, 2013). Consistente com a importância desta regulação, o gene *NCED3* foi altamente induzido em condições de déficit hídrico, em várias culturas economicamente importantes, tais como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (BURBIDGE et al., 1999), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (QIN; ZEEVAART, 1999), feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (IUCHI et al., 2000), abacate (*Persea americana*), (CHERNYS; ZEEVAART 2000), amendoim (*Arachis hypogaea*) (WAN; LI., 2005) e laranja (*Citrus sinensis*) (RODRIGO et al., 2006).

Assim, visando atender à necessidade eminente de cultivares de soja mais tolerantes aos períodos de déficit hídrico, o presente estudo objetivou a obtenção de PGMs com a construção gênica *35S:AtNCED3*, que aumenta de forma constitutiva a expressão do gene *AtNCED*, e possivelmente a atividade enzimática da proteína *AtNCED*. As plantas GM obtidas foram caracterizadas fisiológica e molecularmente em experimentos sob déficit hídrico conduzidos em condições de casa de vegetação. Além de objetivar o desenvolvimento de plantas mais adaptadas, o conhecimento dos processos metabólicos alterados pela super expressão do gene *AtNCED* para a proteção celular contra o déficit hídrico poderá auxiliar no desenvolvimento de outras estratégias de modificação do metabolismo vegetal visando à manutenção dos processos celulares, e logo, minimizar os efeitos danosos dos estresses abióticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soja e estresses abióticos

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma cultura de origem asiática que foi introduzida no Brasil via Estados Unidos (EUA) em 1882, pelo professor Gustavo Dutra da Escola de Agronomia da Bahia. O primeiro registro de cultivo comercial foi em 1914, no município de Santa Rosa, RS, mas foi somente a partir dos anos 40 que ela adquiriu importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional em 1941, no Anuário Agrícola do RS: área cultivada de 640 (hectares) ha, produção de 450 (toneladas) ton e rendimento de 700 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2014; CI SOJA, 2014). Atualmente, o grão cultivado no mundo todo é muito diferente das ancestrais que lhe deram origem, as quais eram espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2014).

A soja é um importante grão na dieta de grande parte da população e sua importância advém de sua versatilidade, sendo considerada fonte de proteínas, fibras, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (SAKAI; KOGISO, 2008; EMBRAPA, 2014). Deste grão derivam também vários produtos e subprodutos da agroindústria tais como farinha de soja desengordurada para fabricação de produtos alimentícios (barra de cereais, balas, alimentos dietéticos, bebidas à base de soja, proteína texturizada de soja) e usos industriais (adesivos); farelo de soja para produção de ração animal (bovinos, aves, suínos, peixes e animais domésticos); proteína isolada para uso comestível (aditivos de alimentos e produtos análogos da carne) e usos industriais (formador de espuma, fabricação de fibra); na forma de grão para produção de alimentos como molho de soja, queijo de soja, soja torrada, fermentada e através do óleo cru produz-se óleo refinado, lecitina, glicerol, esteróis (antioxidantes) e ácidos graxos usados na indústria farmacêutica, cosmética e também alimentícia (APROSOJA, 2014; EMBRAPA, 2015). De todas estas utilidades, 30,7 milhões

de toneladas de soja são transformados em 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas em farelo proteico. Além disso, a soja se constitui em alternativa para fabricação de biodiesel, sendo responsável hoje por 80% da produção deste combustível no Brasil (ANP, 2014; MAPA, 2014).

Apesar de não ser uma espécie nativa, a soja está bem adaptada ao clima brasileiro, colocando nosso país como segundo maior produtor mundial desta oleaginosa desde 1981 (EMBRAPA, 2014), com uma produção de 86,7 milhões de ton na safra 2013/14 (Figura 1), atrás apenas dos Estados Unidos (EUA) com 94 milhões de ton (USDA, 2014). Em 2013, EUA, Brasil e Argentina foram responsáveis por 81,4 % de uma produção mundial de grãos de 285,3 milhões de ton, já em 2014/15 estes números giram em torno de 82,1 % (USDA, 2014). De acordo com o oitavo levantamento de dezembro de 2014, a produção mundial de soja aponta um volume recorde de 312,8 milhões de ton, crescimento de 9,6 % em relação à safra 2013/14 (USDA, 2014).

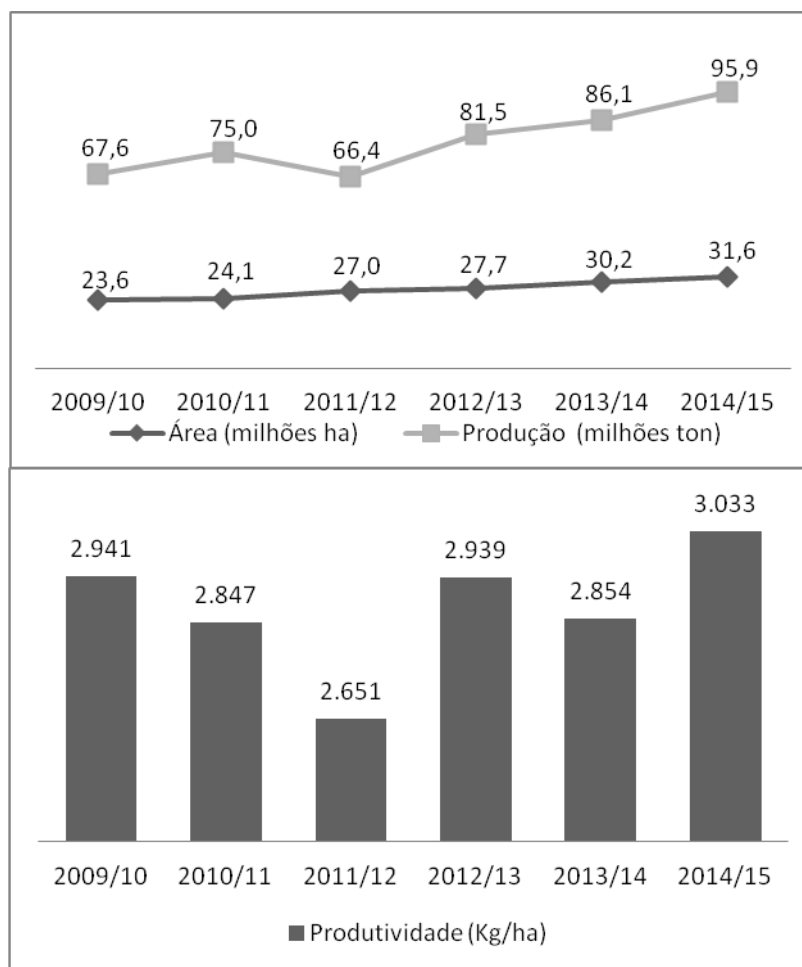


Figura 1. Área, produção e produtividade da soja dos anos safra 2009/10 à 2014/15 no Brasil (CONAB, 2014; EMBRAPA, 2014; CONAB, 2015)

A principal região produtora de soja no Brasil é a Centro-Sul, com uma produção de 83,9 milhões de ton, sendo os principais estados produtores o Mato Grosso, com 28,2 milhões de ton, seguido pelo Paraná, com 17,2 milhões de ton e, por fim, o Rio Grande do Sul, com uma produção de 13,6 milhões de ton na safra 2014/15. Os outros estados produtores somam juntos uma produção de 37 milhões de ton (CONAB, 2015). No entanto, a produção brasileira de grãos tem potencial para atingir o volume de 202,2 milhões de toneladas. Este resultado representa um crescimento de 4,5 % (8,8 milhões de ton) quando comparado à produção obtida na safra 2013/14 (193,4 milhões de ton). No contexto da produção total de grãos, que gira em torno de 195,5 milhões de ton, a soja representa o principal grão produzido no país com 95,9 milhões de ton na safra 2014/15, seguido do milho, com 79,1 milhões de ton, e do arroz, com 12,2 milhões de ton (CONAB, 2015) (Figura 2).

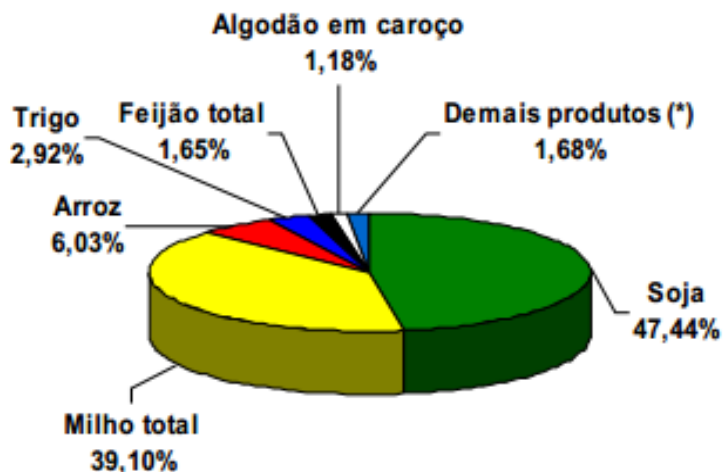


Figura 2. Produção Brasileira total de grãos por cultura. Legenda: (*) Amendoim total, girassol, mamona, sorgo, aveia, canola, centeio e triticale. Fonte: CONAB. Nota: Estimativa em Janeiro de 2015.

Apesar dos números positivos de produção, nos últimos anos devido ao aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca, decorrentes provavelmente das mudanças climáticas, as perdas na produtividade do grão têm sido recorrentes e expressivas (EMBRAPA, 2014). Sabe-se que fatores bióticos e abióticos como o déficit hídrico interferem no crescimento e desenvolvimento da soja, afetando sua produtividade e distribuição espacial e, muitas vezes, a qualidade do grão (BARBOSA et al., 2012). Na safra 2004/5, quando uma rigorosa seca ocorreu, o RS, estado mais atingido, sofreu uma queda de 78% na produção comparado a safra 2002/2003, onde não ocorreram problemas de seca (FARIAS et al., 2011). Ainda neste estado, a estiagem levou a uma redução média de 22% na produtividade da safra 2007/2008, gerando prejuízos em torno de R\$ 1,6 bilhão (EMBRAPA, 2008).

O Paraná, segundo estado maior produtor da oleaginosa, apresentou reduções consideráveis na produtividade na safra 2013/14, derivado do longo período em que a lavoura foi afetada pela ausência de chuvas e altas temperaturas em janeiro e fevereiro, fases importantes do seu desenvolvimento (SEAB, 2014; CONAB, 2014). O clima neste estado reduziu a colheita em 2 milhões de ton (12% da estimativa inicial de 16,5 milhões de ton). No Rio Grande do Sul, apesar do forte incremento na área plantada, a má

distribuição das chuvas ao longo do ciclo produtivo prejudicou o desenvolvimento da cultura, provocando uma redução de 4% nos níveis de produtividade. Perdas na Região Sudeste também foram registradas. Em Minas Gerais, maior produtor regional, a estiagem associada a altas temperaturas em fases importantes da lavoura provocaram significativas perdas de produtividade, reduzindo-a em 10,7% quando comparada à do ano anterior. No Estado de São Paulo, mesmo com o grande incremento da área plantada, as adversidades climáticas provocaram forte redução na produtividade (30,2%). A produção estimada para a Região Sudeste atingiu 5 milhões ton, representando uma redução de 7,6%, quando comparada à do ano anterior (CONAB, 2014). Em números, os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico nos últimos anos (safra 2003/2004 a 2012/2013) alcançam a cifra de US\$ 46,6 bilhões².

Cabe ressaltar que os problemas decorrentes do déficit hídrico não são restritos a algumas áreas produtoras, ao contrário, a seca hoje vem sendo considerada um problema global, pois as áreas atingidas estão se expandindo e a expectativa futura é de que nas próximas décadas, aliado ao déficit hídrico, ocorram ainda aumentos significativos da temperatura média global e da concentração de gases na atmosfera, principalmente dióxido de carbono (CO₂), acarretando um agravamento nas mudanças climáticas em todo o planeta (JAGGARD et al., 2010; ASSAD; PINTO, 2008). Segundo a NASA (2015), o CO₂ atmosférico atualmente está em torno de 385 ppm, sendo que os cientistas consideram 350 ppm o limite de segurança. Além disso, tal índice está aumentando cerca de 2 ppm por ano como resultado da queima de combustíveis fósseis, de modo que a quantidade necessária para garantir a vida na terra é de 275 ppm. Este valor mantém o calor na atmosfera, caso contrário o clima seria demasiado frio para abrigar principalmente a vida humana. Porém, o aumento de CO₂ causa desde o derretimento das geleiras, resultando em aumento do nível do mar, até o aumento na acidez dos oceanos, devido à absorção de CO₂.

Em um estudo de simulações múltiplas, Jaggard e colaboradores (2010) estimaram que por volta de 2050 a temperatura global será em média 1,8°C maior que a atual, e a concentração de CO₂ atmosférico

² Comunicação pessoal: Dr. José Renato Bouças Farias.

será de 550 ppm. Estes dados sugerem que a fisiologia das plantas será alterada significativamente, além de outras diversas variáveis que também devem ser afetadas, como a diminuição das precipitações pluviométricas. Segundo os pesquisadores, o aumento da temperatura alterará o regime de chuvas, de evaporação da água e da transpiração das plantas.

Em outro estudo, realizado por pesquisadores da Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA) e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), os dados mostraram que o aumento de temperatura pode provocar, de um modo geral, diminuição de regiões brasileiras aptas ao cultivo dos grãos, por consequência, diminuição no valor da produção. Em números, o aumento das temperaturas em decorrência do aquecimento global pode provocar perdas nas safras de grãos em torno de R\$ 7,4 bilhões em 2020, número que pode subir para R\$ 14 bilhões em 2070 (ASSAD; PINTO, 2008).

Desta forma, em um futuro próximo, os pesquisadores terão que lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos interferindo diretamente na produção, frequentemente em áreas de plantio já sofridas, diminutas e desgastadas. Aliado a este cenário, segundo Malthus, a população cresce geometricamente e a produção de alimentos aritmeticamente (ALVES, 2002). Assim, com o aumento da população mundial em 66% no ano 2050, a necessidade do aumento na produção de alimentos torna-se evidente diante das mudanças climáticas, da degradação dos solos e da escassez de água (FAO, 2015).

Várias estratégias podem e devem ser utilizadas para minimizar e reduzir os danos decorrentes de longos períodos de déficit hídrico, entre elas as práticas conservacionistas de manejo, como o plantio direto, o controle integrado de plantas daninhas, sistemas de irrigação conforme a disponibilidade e analisando-se os custos, bem como o melhoramento genético, que visam diminuir os prejuízos decorrentes da seca e outros tipos de estresses. Atualmente, a engenharia genética, através da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se mais uma ferramenta viável e acessível para a obtenção de plantas mais tolerantes a estresses abióticos como o déficit hídrico.

No âmbito científico, os estudos realizados têm concentrado esforços na obtenção de plantas que tolerem períodos mais prolongados de

déficit hídrico não de forma paliativa, almejando somente a sobrevivência temporária da planta, mas principalmente buscando entender os mecanismos desencadeados em resposta ao estresse que auxiliam a planta a administrar o uso da água e a direcionar suas energias de forma sistêmica em condições ambientais adversas, uma vez que, molecularmente, para responder à seca, alguns genes são expressos e atuam desencadeando cascatas gênicas que tentam controlar/minimizar os danos causados pelo déficit hídrico.

Neste contexto, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) com genes que conferem tolerância à seca poderá contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico. Desta forma, a manipulação de fatores de transcrição responsáveis pela ativação de cascatas gênicas que conferem respostas induzidas à seca e também o uso de genes chaves em vias metabólicas específicas envolvidas na defesa vegetal ao déficit hídrico tem sido alvo de diversos estudos.

Dentre os diversos métodos disponíveis de transformação genética em plantas utilizados na inserção de genes, destacam-se o sistema via *Agrobacterium tumefaciens* e a técnica de biobalística (ARAGÃO et al., 2000; ARAGÃO, 2002; RECH et al., 2008).

Neste contexto, visando atender às necessidades do produtor brasileiro, a Embrapa Soja atua em pesquisas com soja GM desde 1997, quando em parceria com a iniciativa privada passou a incorporar às suas cultivares convencionais, o gene de tolerância ao herbicida glifosato, lançando algumas cultivares de soja transgênicas, dentre elas a BRS 243RR, BRS 245RR, BRS 246RR, BRS 255RR, BRS 256RR, BRS 294RR, BRS 295RR, BRS 316RR e BRS 334RR (EMBRAPA, 2015). A introdução de cultivares transgênicas “RR” (*Roundup Ready*®) provocou mudanças significativas no manejo da agricultura brasileira (DALBOSCO, 2013).

Mais recentemente, a Embrapa Soja em parceria com o JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*) instituição japonesa de pesquisa científica, vem direcionando esforços para o desenvolvimento de plantas de soja geneticamente modificadas visando maior tolerância à seca (EMBRAPA, 2014). Alguns eventos promissores contendo os fatores de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding* – Elemento de ligação de resposta a desidratação) e AREB (*ABA Responsive*

Element Binding - Elemento de ligação de resposta ao ABA) já foram obtidas e caracterizadas, no entanto, genes de outras vias metabólicas de resposta ao déficit hídrico também vêm sendo exploradas.

2.2 Uso de fatores de transcrição no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes ao déficit hídrico

Muitas evidências apontam para a presença de duas vias regulatórias de resposta ao déficit hídrico em plantas, uma dependente do ácido abscísico (ABA) e outra independente do ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). De modo geral, os produtos dos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, como o déficit hídrico, atuam como osmoprotetores, antioxidantes celulares, proteínas *turn over*, proteínas de sinalização de estresse e de regulação transcricional e podem ser divididos resumidamente em dois grandes grupos. O primeiro grupo inclui as proteínas funcionais que atuam no metabolismo celular e que, provavelmente, contribuem para a tolerância ao estresse, como proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant* - Abundantes na embriogênese tardia), osmotinas, proteínas anticongelantes, proteínas de ligação ao mRNA, enzimas chaves na biossíntese de osmólitos, proteínas de canais de água, transportadores de açúcar e prolina, além das enzimas de desintoxicação e várias proteases. O segundo grupo é composto por proteínas reguladoras incluindo várias quinases, fosfatases, genes do metabolismo de fosfolípidos, da biossíntese de ABA, além dos genes que codificam fatores de transcrição como *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding* – Elemento de ligação de resposta a desidratação), *AREB* (*ABA Responsive Element Binding* - Elemento de ligação de resposta ao ABA), *MYC* (*Myelocytomatosis oncogene*), *MYB* (*Myeloblastosis oncogene*), *NAC* (*NAM*, *ATAF 1,2* e *CUC*), *HB* entre outros. Estes genes reguladores atuam não somente na tolerância, mas também nas etapas iniciais de indução e regulação da expressão de genes e na tradução de sinais em resposta ao déficit hídrico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) (Figura 3).

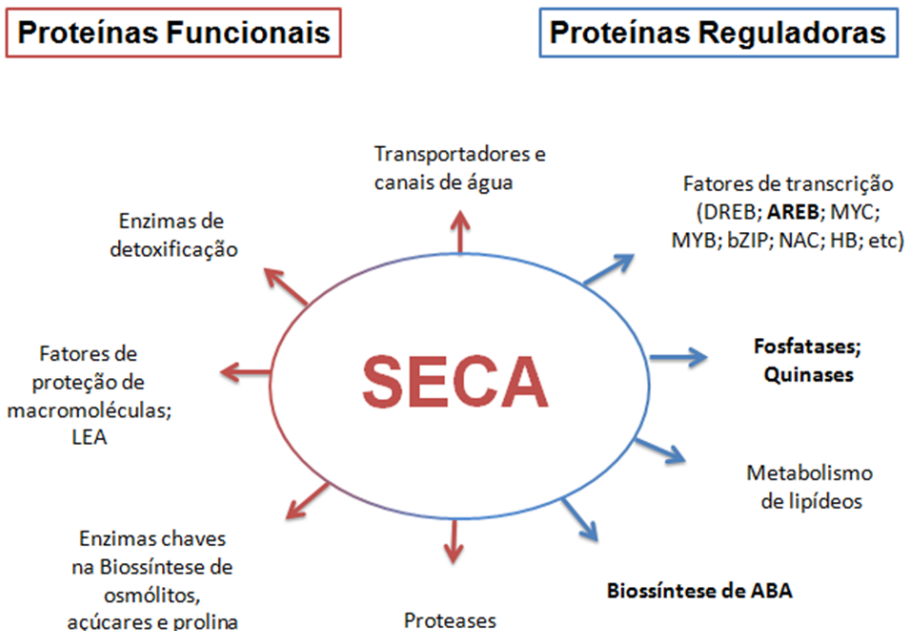


Figura 3. Produtos gênicos envolvidos na tolerância ao estresse. Os produtos dos genes são classificados em dois grupos. O primeiro inclui as proteínas funcionais (em vermelho) e o segundo grupo contém as proteínas regulatórias (em azul). Adaptado de SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, (2007).

Muitos fatores de transcrição (FTs) induzidos ou não pelo ABA já foram identificados como seca-responsivos e vêm sendo utilizados no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, com grande potencial para obtenção de variedades com aumento da tolerância às mudanças climáticas como seca e frio e à alta salinidade e congelamento (FUJITA et al., 2011). Estes FTs atuam como uma chave regulatória envolvida na expressão, na regulação gênica e na transdução de sinais em resposta ao estresse ambiental. Dentre os FTs já identificados como seca-responsivos e utilizados no desenvolvimento de plantas GMs estão os genes das famílias DREB e AREB. Estes FTs atuam, respectivamente, na via independente e dependente de ABA em resposta à seca nos vegetais. Pela ligação às regiões específicas DREB e ABRE (respectivamente) na região promotora de genes alvos, os FTs DREB e AREB ativam a transcrição de genes *downstream* responsáveis pelas respostas defensivas de proteção celular ao déficit hídrico (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; XU et al. 2008; NAKASHIMA et al., 2009; MIZOI et al., 2012).

A inserção do FT *AtDREB1A* sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A* aumentou com sucesso a tolerância à seca em

Arabidopsis thaliana (LIU et al., 1998; JAGLO-OTTONSEN et al., 1998; GILMOUR et al., 1998), tabaco (KASUGA et al., 2004), arroz (DUBOUZET et al., 2003; ITO et al., 2006), milho (QIN et al., 2004; 2007), trigo (PELLEGRINESCHI et al., 2004; GAO et al., 2008) amendoim (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007; DEVI et al., 2011; VADEZ et al., 2013) e soja (POLIZEL et al., 2011, ROLLA et al., 2014). Particularmente em soja, linhagens GMs DREB1A mostraram em experimentos em casa de vegetação respostas mais favoráveis ao déficit hídrico relacionadas à maior expressão de genes de defesa contra a dessecação, como os genes envolvidos na regulação da abertura dos estômatos, que garantem maior eficiência na condutância estomática e nas taxas fotossintética e transpiratória, apresentando menores temperaturas foliares. Genes envolvidos na osmoproteção que codificam proteínas que funcionam como canais de água e garantem maior captação de água e maior eficiência no uso da água pela planta e ainda genes que, entre outras funções, protegem as estruturas celulares garantindo o funcionamento dos processos metabólicos vitais das plantas também foram identificados. Fisiologicamente, as plantas GMs apresentaram alta taxa de sobrevivência após um severo período de deficiência hídrica e importantes respostas à privação de água como eficiência fotossintética (POLIZEL et al., 2011). Em condições de campo, os dados mostraram que embora as plantas DREB1A não tenham superado a cultivar convencional BR 16 (isolinha) em termos de rendimento, alguns componentes de produção como número de sementes, número de vagens com sementes e número total de vagens foram maiores na linhagem transgênica quando o déficit hídrico foi induzido no período vegetativo (ROLLA et al., 2014).

Além do gene DREB1A, outro fator de transcrição da família DREB, o gene *DREB2A*, vem sendo utilizado na obtenção de plantas mais tolerantes à seca, salinidade e calor (SAKUMA et al., 2006a, 2006b; QIN et al., 2007; CHEN et al., 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, os homólogos DREB2A e DREB2B são ativados em resposta à seca e salinidade. No entanto, trabalhos mostraram que DREB2A pode induzir a expressão de vários genes de resposta ao calor (estresse induzido pelo aumento da temperatura ambiental), estresse ao qual DREB1A não confere tolerância. Trabalhos utilizando DREB2A CA (forma constitutivamente ativa - CA), sob o controle do promotor constitutivo

35S ou estresse-induzido rd29A, e genes homólogos de DREB2A em *Arabidopsis* (QIN et al., 2007) e soja (CHEN et al., 2007) sugerindo que DREB2A pode promover a indução da expressão de genes *downstream* de resposta à estes estresses abióticos em diferentes espécies vegetais. Em soja, linhagens GMs rd29A:AtDREB2A mostraram altos níveis de expressão em raízes sob estresse, com redução na fotossíntese e condutância estomática aos 30 min de tratamento (ENGELS et al., 2013). Experimentos em casa de vegetação mostraram ainda que as linhagens transgênicas transpiraram menos que a cultivar convencional BR 16, sugerindo um mecanismo de conservação de água (ENGELS et al., 2013).

Considerando-se os genes presentes na via de resposta à seca dependente de ABA, o FT AREB (*Abscisic acid responsive elemento binding protein*) isolado de *Arabidopsis thaliana* é uma proteína de ligação ao elemento de resposta ao ácido abscísico ou ABF (ABRE – *binding factors*). Estudos demonstraram a expressão de AREB1 em condições de déficit hídrico (YOSHIDA et al., 2010). Outros estudos demonstram que plantas transgênicas expressando a forma fosforilada de AREB1 induzem muitos genes ABA responsivos sem a aplicação de ABA exógeno (FUJITA et al., 2005). Especificamente em soja, construções contendo o gene *AREB1* foram inseridas com sucesso. Para a construção 35S:AtAREB1ABF, oito eventos positivos foram obtidos. A análise da expressão gênica relativa mostrou que o transgene foi superexpresso em todas as linhagens GMs. Experimentos em casa de vegetação revelaram duas linhagens com melhoria na tolerância ao déficit hídrico uma vez que elas sobreviveram a seis dias de irrigação suspensa e três dias após reidratação não apresentaram nenhum dano foliar. Além disso, a fotossíntese destas linhagens foi significativamente maior que a da cultivar sensível à seca BR 16 (BARBOSA et al., 2012).

Também para outra construção gênica contendo o gene *AREB1*, 35S:AtAREB1 Δ QT, em condições de déficit hídrico, as plantas transformadas apresentaram maior taxa de sobrevivência (100%), uma melhor eficiência do uso da água e maior número de folhas que sua isolinha, a cultivar BR 16. As plantas transgênicas apresentaram também maior condutância estomática em condições bem irrigadas. A diferença no grau de murchamento e a porcentagem de sobrevivência entre as plantas 35S:AtAREB1 Δ QT e sua

sua isolinha BR 16 poderia estar relacionada à regulação e expressão de genes que protegem contra a desidratação, uma vez que não foi observado nas plantas transgênicas, mesmo em condições de aumento da concentração intercelular de CO₂, nenhum comprometimento metabólico da fotossíntese (LEITE et al., 2014).

2.3 Uso de genes de vias metabólicas responsivas à seca no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes ao déficit hídrico

De modo geral, o déficit hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse pelas raízes, que desencadeia uma cascata de eventos moleculares, finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. As plantas habitualmente apresentam algumas estratégias de aclimatização para tolerar o déficit hídrico. Estas podem ser divididas em adaptações morfológicas ou de natureza fisiológica. Dentre as morfológicas estão as alterações foliares, a abscisão foliar, o crescimento radicular e o desenvolvimento de ceras, pêlos e espinhos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

De modo geral, as estratégias de resposta vegetal ao déficit hídrico podem ser classificadas em três grupos distintos: escape, evasão e tolerância (TURNER et al., 2001). No escape, as plantas adotam uma estratégia de “fuga” apresentando rápido desenvolvimento fenológico, sendo capazes de completar seu ciclo de vida antes que o déficit hídrico torne-se severo o bastante para provocar dano fisiológico (HEATHERLY; ELMORE, 2004; VERSLUES et al., 2006). O segundo mecanismo, a evasão, envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula durante períodos de deficiência hídrica, seja pela maior eficiência na absorção de água através das raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. Desta forma, as plantas evitam a seca aumentando o teor relativo de água, utilizando menos água disponível, mantendo uma baixa condutância na epiderme e ainda diminuindo as trocas gasosas (MANALAVAN et al., 2009). O terceiro mecanismo de defesa é a tolerância que consiste na síntese de osmoprotetores, promovendo a manutenção do turgor e o desenvolvimento da evasão. Este mecanismo envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula durante períodos de deficiência hídrica mesmo com baixa

quantidade de água disponível no solo (NGUYEN et al., 1997) (Figura 4), sendo que grande parte destas respostas são mediadas pelo ABA.

Mecanismos de tolerância à seca



Figura 4. Características fisiológicas e anatômicas associadas às respostas vegetais ao déficit hídrico em soja. Escape: as plantas adotam uma estratégia de “fuga” apresentando rápido desenvolvimento fenológico (VERSLUES et al., 2006). Evasão: envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula por modificações morfológicas durante períodos de deficiência hídrica. Tolerância: envolve a estratégia de manter níveis altos de água no interior da célula, incluindo modificações moleculares durante períodos de deficiência hídrica (MANAVALAN et al., 2009, adaptado pelo autor).

As respostas fisiológicas ou adaptações vegetais à seca dependem do tempo de duração da desidratação (rápido ou lento) e da intensidade. O efeito da deficiência hídrica na produção depende ainda da época de ocorrência, de sua severidade, do genótipo da planta e do estágio de desenvolvimento vegetal (BERLATO, 1981; FAGERIA, 1989; CHAVES et al., 2003).

Durante a progressão das respostas ao déficit hídrico, ocorre no xilema um aumento na concentração de ABA, responsável por controlar inúmeras respostas adaptativas ao estresse, tais como a ativação de genes ligados ao ajustamento osmótico, compartimentalização iônica, crescimento e

modulação das raízes e sua condutividade hidráulica, limitação da taxa de transpiração, controle da desidratação, promoção do fechamento estomático e diminuição do crescimento foliar (HSIAO, 1973; SALISBURY; ROSS, 2013).

Este fitormônio é sintetizado em todas as células que possuem cloroplastos (TAIZ; ZEIGER, 2013), coordenando uma complexa rede regulatória que possibilita a sobrevivência das plantas mesmo em condições de baixa disponibilidade de água (CUTLER et al., 2010; KIM et al., 2010). Desempenha ainda um importante papel na fase embrionária e germinativa das plantas e na dormência das sementes, estando envolvido também na manutenção do ritmo circadiano (ZEEVAART, 1999; LEGNAIOLI et al., 2009). O ABA pode ainda se ligar em regiões específicas nos promotores dos genes relacionados a respostas a estresses abióticos, induzindo sua expressão (BARBOSA et al., 2012). Segundo Fujita (2011), em *Arabidopsis thaliana* este fitormônio controla a expressão de aproximadamente 10% dos genes que codificam proteínas.

Os efeitos do ABA e do déficit hídrico são similares nas plantas. Assim, o fechamento estomático, por exemplo, pode ocorrer por sinais hidráulicos (potencial de água na folha e turgor celular) e/ou sinais químicos (ABA). No entanto, pesquisas sugerem uma combinação de sinalização que pode ocorrer ao mesmo tempo ou em tempos diferentes (COMSTOCK, 2002; KALEFETIGLU; EKMEKÇI, 2005).

Estudos têm demonstrado ainda que, em condições de seca, o ABA provê o crescimento das raízes, via supressão do acúmulo do etileno, e contribui para a condutividade hidráulica, aumentando a atividade das aquaporinas, proteínas transportadoras de água localizadas nas membranas celulares (SHARP, 2002). Outros estudos mostram também que, na ocorrência de déficit hídrico, o ABA atua diminuindo a taxa de transpiração e no controle do murchamento, promovendo o fechamento dos estômatos nas células-guarda e controlando o fluxo de solutos nas células do procâmbio (AGARWAL; JHA, 2010). Alterações também têm sido detectadas na expressão de genes regulados pelo ABA como proteínas envolvidas na embriogênese tardia (proteínas LEA), diversas proteínas regulatórias como fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases, uma variedade de transportadores, e enzimas envolvidas na síntese de osmoprotetores, sinalização fosfolipídica,

metabolismo de ácidos graxos, metabolismo celular, metabolismo de carboidratos e metabolismo secundário, ou seja, mecanismos que aumentam a capacidade da planta em tolerar condições de déficit hídrico (SEKI et al., 2007; CUTLER et al., 2010; KIM et al., 2010).

Muitos destes genes de resposta vegetal ABA-induzidos atuam desencadeando cascatas gênicas que tentam controlar, minimizar ou mesmo reduzir os danos causados pelo déficit hídrico. Em resumo, a expressão de genes ABA-responsivos é diretamente regulada por fatores de transcrição que reconhecem e se ligam à *cis*-elementos específicos presente nas regiões promotoras à montante dos seus genes-alvos (Figura 5). A expressão dos genes mediada por ABA é ainda controlada pelos receptores, mensageiros secundários, cascatas de proteínas quinases, proteínas fosfatases e fatores de remodelação (FUJITA et al., 2011).

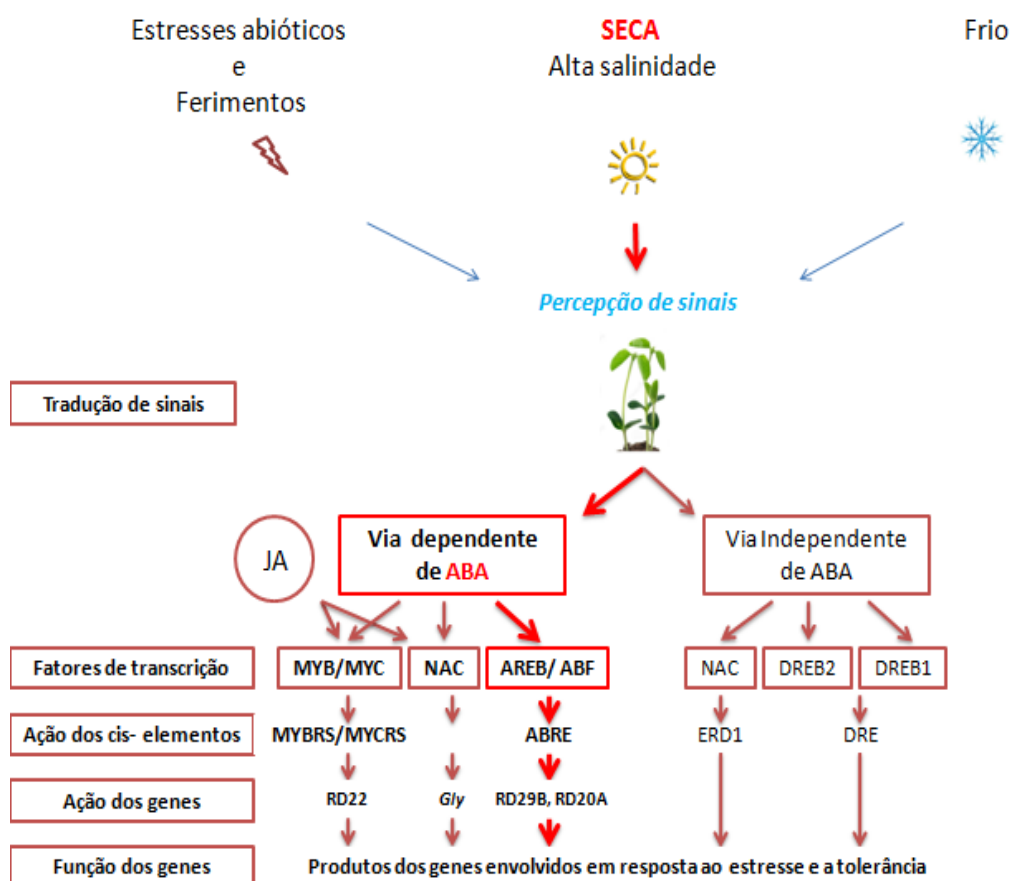


Figura 5. Redes regulatórias de transcrição de respostas ao estresse abiótico e expressão gênica. O esquema ilustra as vias dependentes e independentes de ABA, a ativação de genes e os sinais de transdução em resposta à seca, alta salinidade e frio. (Modificado a partir de SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007, adaptado pelo autor).

A sinalização do ABA em células vegetais tem sido dividida em três diferentes etapas: metabolismo e transporte de ABA, percepção e transdução de sinais de ABA, e sinalização de resposta e modulação. Os componentes de sinalização que geram a percepção e transdução de sinais incluem receptores *Pyrabactin Resistance* (PYR), um componente da Regulamentação do Receptor de ABA (RCAR) (MA et al., 2009), um grupo da proteína fosfatase tipo 2Cs (PP2Cs) (SCHWEIGHOFER et al., 2004) e os membros do grupo das quinases, a proteína quinase tipo 2 SNF-Relacionadas (SnRK2) (UMEZAWA et al., 2009). Existem receptores nucleares para ABA, de membrana e também receptores citoplasmáticos. Segundo Umezawa et al. (2009), cada PP2C ou SnRK2 tem interações proteína-proteína seletivas. Em geral essas interações são limitadas pela sua localização subcelular, que também pode ser importante para a composição do complexo de sinalização de ABA. (Figura 6) (UMEZAWA et al., 2010).

Na presença de ABA, a formação do complexo PYR/RCAR-PP2C sequestra a fosfatase, desligando-a das quinases, permitindo assim a ativação de SNRK2s, que têm como alvo canais iônicos, NADPH-oxidases e fatores de transcrição como ABF/AREB (Figura 7) (SATO et al., 2009).

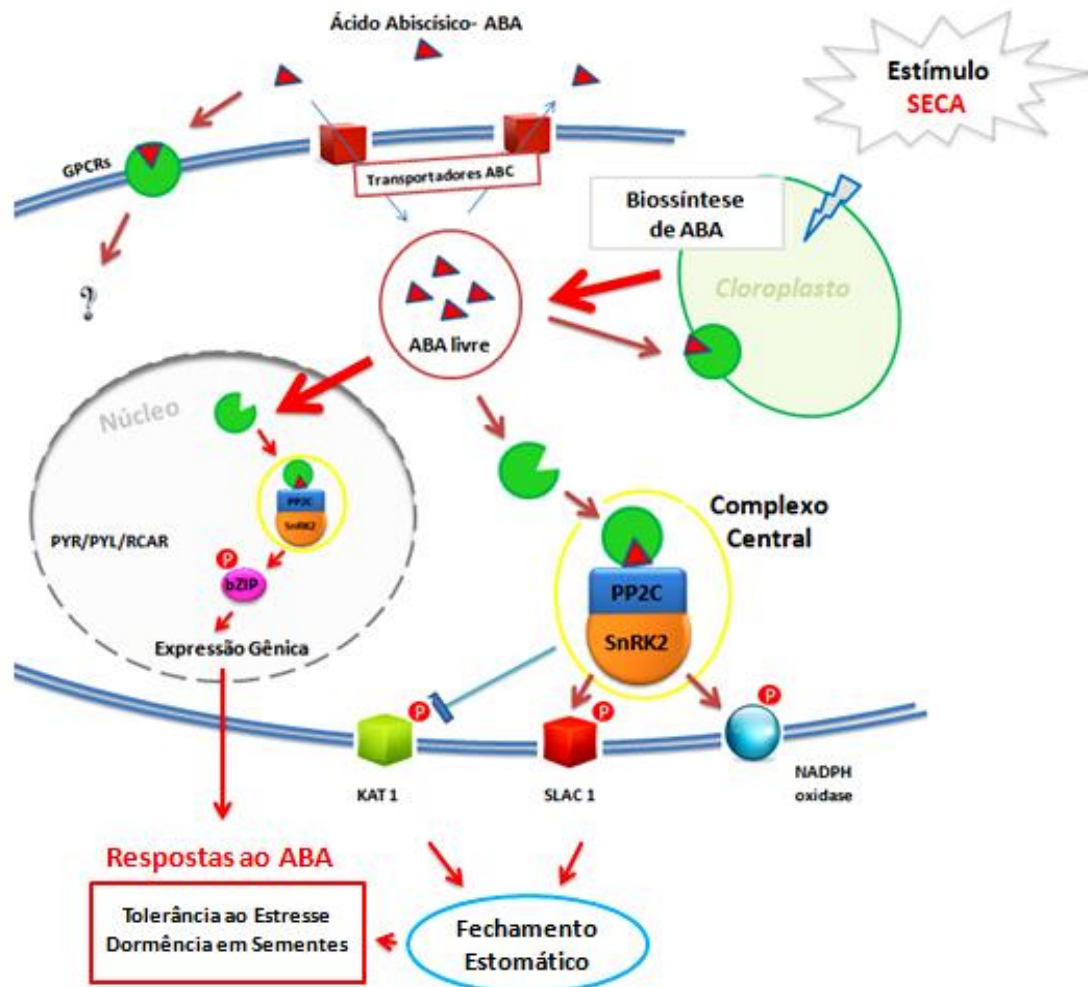


Figura 6. Visão de sensoriamento, sinalização e transporte de ABA. Os componentes relacionados com ABA são PYR/PYL/RCAR, PP2C e SnRK2 que formam um complexo de sinalização no núcleo, regulando diretamente a expressão dos genes dependentes de ABA por fosforilação de fatores de transcrição AREB/ABF. Por sua vez, no citoplasma, o complexo do núcleo pode sair da membrana plasmática e fosforilar canais de ânions (SLAC1) ou canais de potássio (KAT1) para induzir o fechamento dos estômatos em resposta ao ABA. O cloroplasto também possui receptores de ABA em sua membrana, respondendo também em condições de déficit hídrico. O nível de ABA endógeno é um dos principais determinantes do sensoriamento mantido pela biossíntese, catabolismo ou transporte do ABA. Os movimentos de ABA são indicados pelas setas vermelhas (UMEZAWA et al., 2010, adaptado pelo autor).

a) Ausência de ABA

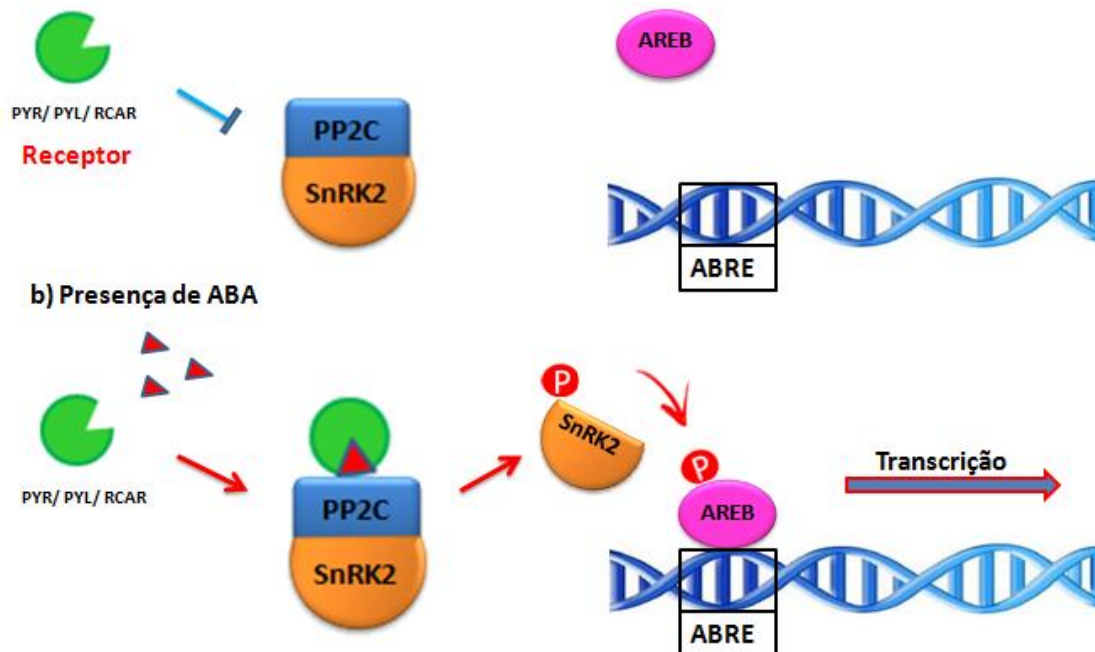


Figura 7. Via de Sinalização ABA dependente. a) Quando ABA está ausente, a fosfatase PP2C fica livre para inibir a autofosforilação da família de quinases SnRKs. b) Neste caso, ABA está presente, permitindo que a família de proteínas PYR/PYL/RCAR se ligue e sequestre a fosfatase, que se desliga das quinases. Consequentemente, a quinase não é mais inibida pela fosfatase, e assim se auto-ativa e pode então fosforilar e ativar fatores de transcrição *downstream* (AREB/ABF) e iniciar a transcrição nos elementos promotores ABA-responsivos (AREBs) (SHEARD; ZHENG, 2009, adaptado pelo autor).

Em plantas vasculares, evidências estruturais e moleculares mostram que os membros da família PYR/RCAR desempenham um papel central na detecção do ABA. Estudos de genômica demonstram que proteínas correlacionadas com PYR/RCAR são encontradas apenas em plantas terrestres (MA et al., 2009; PARK et al., 2009).

As proteínas fosfatases tipo 2C (PP2Cs) são as proteínas mais caracterizadas envolvidas na sinalização de ABA. Em eucariotos, estas inibem cascatas ativadas por estresse desfosforilando MAPKs e receptores *like* quinase (SCHWEIGHOFER et al., 2004). O grupo A encontrado em *Arabidopsis thaliana* está relacionado à sinalização do ABA e inclui ABI1, ABI2, HAB1 (P2C-HA) e PP2CA (AHG3), demonstrando uma relação direta com os receptores ABA PYR/RCAR (MA et al., 2009; PARK et al., 2009).

As proteínas quinases que atuam na sinalização do ABA pertencem aos grupos SnRK2, SnRK3 (CIPK), CDPK (HUMBBARD et al.,

2010, KUDLA et al., 2010), e às famílias da MAPK (JAMES et al., 2009; COLCOMBET; HIRT, 2008). As três primeiras subfamílias da classe SNF-1-*like* são encontradas principalmente em plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, a subfamília SnRK2 é composta por 10 membros que foram categorizados em três subclasses diferentes (1, 2, e 3) (KOBAYASHI et al., 2004). Com exceção de SNRK2.9, todas são ativadas por estresses osmótico e salino (BOUDSOCQ et al., 2004). As SnRK2. 2/3/6/7/8 são ativadas por ABA, e membros da classe 3 SnRK2. 2/3/6 apresentam uma ligação mais forte para ativação do ABA (BOUDSOCQ et al., 2004). Por outro lado, Yoshida et al. (2006) demonstraram que a SNRK2.6 (OTS1), mesmo sendo considerada uma quinase de forte ligação ao ABA, pode também ser ativada por estresse osmótico de forma independente de ABA.

2.4 Via biossintética do ABA

Devido a sua estreita relação com o déficit hídrico, detalhes da biossíntese do ABA em plantas superiores vêm sendo desvendados desde a década passada (NAMBARA; MARION-POLI, 2005).

Este fotormônio é sintetizado pela via dos terpenos ou terpenóides, considerados o maior grupo de metabólitos secundários, derivada da rota do ácido mevalônico, gerado a partir de três moléculas de acetil-CoA ou em uma segunda rota denominada MEP (metileritritol fosfato) (SEO; KOSHIBA, 2002).

A biossíntese do ABA pode ainda ocorrer através de duas vias, a via direta e a indireta. Na via direta, o farnesilpirofosfato (FPP) dá origem ao ABA diretamente e, na via indireta, o ABA é sintetizado a partir do composto intermediário xantoxina (Figura 8) (SEO; KOSHIBA, 2002).

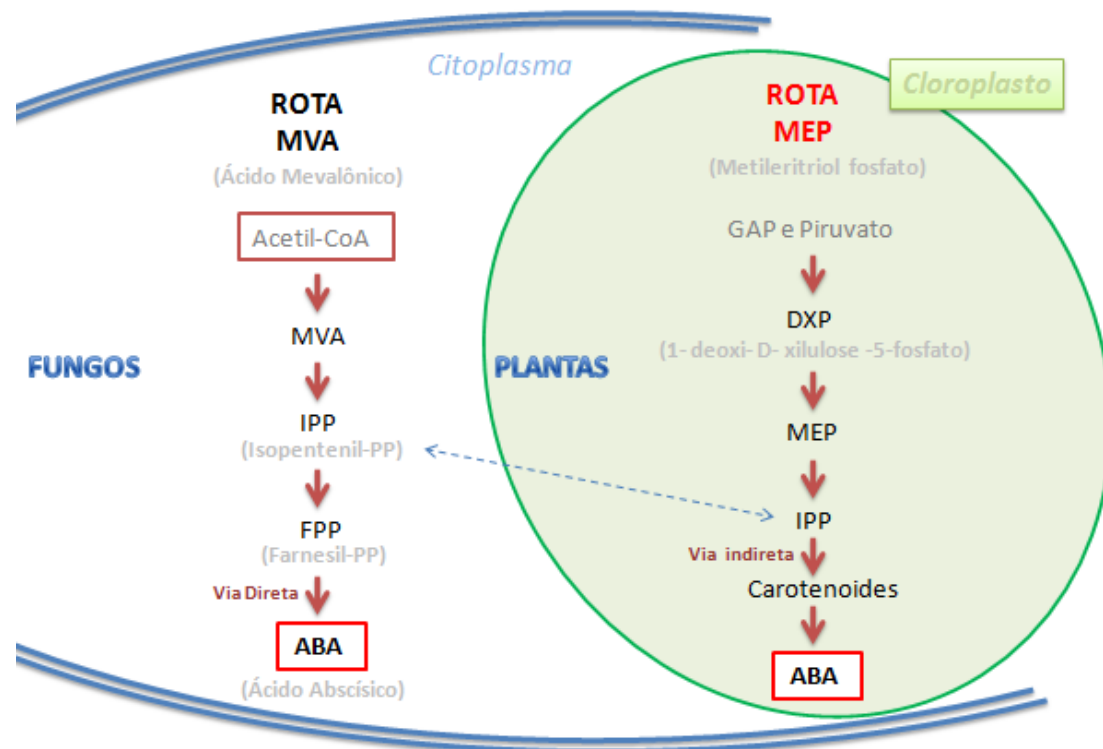


Figura 8. Rotas biossintéticas de ABA. a) Rota MVA (ácido mevalônico). Geralmente encontrada em fungos, é considerada a via direta, derivada do acetil-CoA, gerando seu produto final ABA. b) Rota MEP (metileritriol fosfato), considerada a via indireta, na qual o ABA é sintetizado a partir de um composto intermediário denominado xantoxina (SEO; KOSHIBA, 2002, adaptado pelo autor).

Estudos de genética molecular de várias plantas deficientes em ABA têm contribuído para a identificação de genes envolvidos na via da biossíntese do hormônio (XIONG; ZHU, 2003). Com bases nestes estudos, foi proposto que na via indireta a síntese do ABA inicia-se através das zeaxantinas, um epoxicarotenóide C_{40} . As zeaxantinas são produzidas como trans-isômeros após a ciclização e hidroxilação de todos os trans-licopenos da via β -caroteno. As etapas seguintes consistem na síntese de cis-isômeros, como a violaxantina e neoxantina, clivadas para formar o precursor do ABA. A conversão da zeaxantina em violaxantina é catalisada pela zeaxantina epoxidase (ZEP, EC 1.14.13.90), via intermediária da anteraxantina. A enzima 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED, EC 1.13.11.51) cliva os cis-isômeros violaxantina e neoxantina em produtos C_{15} , xantoxinas e ao metabólito C_{25} , o qual é convertido em ABA no citosol (NAMBARA; MARION, 2005).

A forma biologicamente ativa do ABA é produzida pelas cis-xantoxinas em dois passos enzimáticos através da via intermediária aldeído abscísico. Essa conversão da xantoxina pelo aldeído abscísico para o ABA é catalisada pela proteína *AtABA2*, pertencente à família SDR (desidrogenase/reductase de cadeia curta). Em *Arabidopsis thaliana*, esta proteína é codificada por um gene único no genoma. Portanto, na perda de sua função, ocorre uma deficiência grave de ABA (GONZALEZ-GUZMNA et al., 2002).

A oxidação do aldeído abscísico para o ácido carboxílico é o passo final da biossíntese do ABA, catalisado pela enzima aldeído abscísico oxidase 3 (AAO3, EC 1.2.3.14) (SEO et al., 2000). Assim, evidências indicam que a reação de clivagem oxidativa é um processo chave na regulação da biossíntese do ABA (Figura 9) (TAYLOR et al., 2000).

Alguns estudos utilizando mutantes deficientes ou sensíveis ao ABA indicam a via indireta como a mais importante nas plantas (SEO; KOSHIBA, 2002).

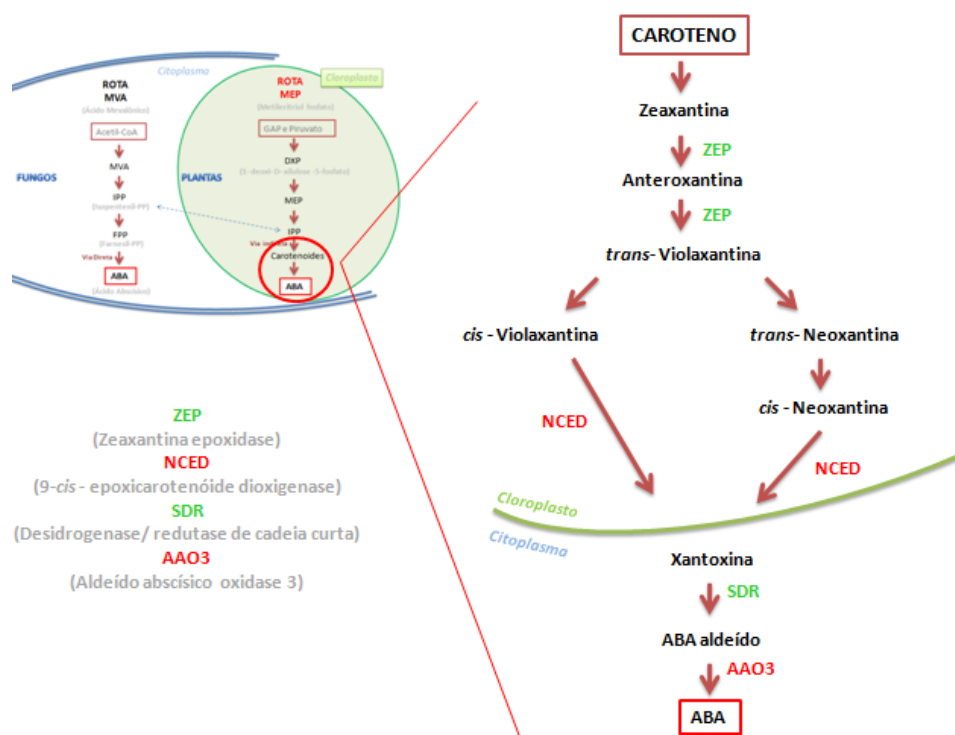


Figura 9. Síntese e clivagem de carotenóides nos plastídios e a biossíntese de ABA no citoplasma vegetal. A conversão inicia-se no cloroplasto, onde ocorre a conversão da cis-violaxantina e trans-neoxantina em cis-neolaxantina. Em seguida, a enzima NCED converte estas duas moléculas em xantoxina. No citoplasma, a xantoxina é convertida em ABA-aldeído, que por fim será convertido em ABA pela enzima AAO₃. (NAMBARA; MARION, 2005 adaptado pelo autor).

Vários estudos têm demonstrado que, sob certas condições, o ABA regula sua própria biossíntese e catabolismo em nível transcricional (XIONG et al., 2002). Experimentos realizados por Grasseman et al. (2008) demonstraram uma regulação positiva mediada pelo ABA para transcrição de zeaxantina epoxidase, aldeído oxidase e ABA hidroxilase. Neste estudo, o ABA apresentou uma forte regulação positiva na transcrição do *NCED3*. Estes resultados corroboram o papel estabelecido para o gene *NCED* na resposta às condições de déficit hídrico.

Em estudo realizado por Chan (2012) com base em dados de microarranjos, os níveis de transcrição dos principais componentes das vias de sinalização do ABA foram comparados após déficit hídrico induzido durante 3h, ao frio durante 24h e sob tratamento com ABA exógeno. Os autores observaram que tanto em condições de estresse abiótico quanto no tratamento com ABA exógeno houve aumento nos níveis transcricionais das enzimas envolvidas no metabolismo do ABA, como o *NCED* e a *AAO3*.

2.5 *NCED3* (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase) e o déficit hídrico

O primeiro gene *NCED* (*VP14*) foi identificado a partir de um mutante de milho (*Zea mays*) ABA-deficiente apresentando viviparidade na semente. Neste caso, as sementes não apresentavam dormência, podendo germinar ainda na espiga, e as plantas não toleravam o déficit hídrico. O mutante *VP14* apresentou defeito na biossíntese de ABA devido à inserção de um transposon. O gene foi clonado e a proteína recombinante foi capaz de clivar 9 *cis*-violaxantina em *cis*-xantoxinas. A atividade da enzima requer ferro e oxigênio para formar *cis*-isômeros de xantoxinas (SCHWARTZ et al., 1997).

Em *A. thaliana*, o gene *AtNCED3* está envolvido na resposta à privação de água e no processo biossintético do ABA, bem como na resposta à salinidade e ao estresse osmótico. É formado por uma região codificante de 1800 pb, não apresentando região intrônica. As regiões 5' e 3'UTRs (*Untranslated Region*) tem 122 e 390 pb, respectivamente. Um estudo realizado com o gene *EuNCED*, isolado de eucalipto não apresentou indícios de *introns* quando realizado o alinhamento entre sequências das proteínas *EuNCED* e *AtNCED3* (SANTORO, 2010), sendo esta uma importante

característica desta enzima que denota a ausência de *íntrons* nos cinco genes da subfamília *AtNCED3* (TAN et al., 2003). A literatura mostra que quando as plantas são submetidas a diversos estresses severos a eficiência do *splicing* de *íntrons* pode sofrer degradação (BOURNAY et al., 1996; MARRS; WALBOT, 1997), porém a ausência de *íntrons* pode significar um mecanismo para aumentar a expressão de *NCED* e conseqüentemente a síntese do ABA sob déficit hídrico.

Em *Arabidopsis thaliana*, nove sequências *NCED* relacionadas foram identificadas. Destas, cinco (*NCED 2, 3, 5, 6, e 9*) codificam enzimas produtoras de xantoxinas, atividade demonstrada pela clivagem de cis-xantoxinas por *VP14 in vitro* (IUCHI et al., 2001; TOH et al., 2008), proteína que catalisa a clivagem do ácido 9-cis-xantoxila em ABA, em uma reação que requer oxigênio (SCHWARTZ et al., 1997). Ainda em *Arabidopsis*, Iuchi et al. (2001) observaram que com uma expressão do gene *NCED3* ocorre também o aumento nos níveis de ABA endógeno e a expressão induzida de genes da seca ABA responsivos (*rab18, kin1, rd29B*), além da redução da transpiração e o aumento da tolerância à seca pela redução na abertura estomática. Desta forma, com o acúmulo de ABA em folhas, houve, conseqüentemente, redução da perda de água e maior tolerância à seca, comparado às plantas não-transformadas (HWANG et al., 2010). Além disso, foi demonstrado o envolvimento do *NCED3, NCED5 e NCED6* na biossíntese do ABA, pela observação do aumento dos níveis deste fitormônio, enquanto *NCED6 e NCED9* foram relacionados à produção de ABA no embrião e no endosperma, o que impõe a dormência (IUCHI et al., 2001; LEFEBVRE et al., 2006; FAN et al., 2009; MARTINEZ-ANDUJAR et al., 2011).

O estudo de Frey et al. (2012) em *Arabidopsis thaliana* demonstrou ainda que em tecidos vegetativos a combinação do *NCED5* e mutações no *NCED3* aumentou a perda de água, causando desidratação e diminuição dos níveis de ABA. Assim, o *NCED5* contribui juntamente com o *NCED3* para a produção de ABA, afetando o crescimento da planta e a tolerância à seca. A expressão do gene *NCED3* foi maior nas extremidades das raízes, periciclo e células do córtex na base das raízes laterais, e também expresso em flores. Além disso, é o principal gene induzido em condições de estresse abióticos (IUCHI et al., 2001).

Depois de identificados em milho e *Arabidopsis thaliana* (IUCHI et al., 2001), os genes *NCED* foram subsequentemente identificados em várias outras espécies de plantas (NAMBARA; MARION-POLI, 2005), inclusive em algumas de importância econômica, tais como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (BURBIDGE et al., 1999), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (QIN; ZEEVAART, 1999), feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (IUCHI et al., 2000), abacate (*Persea americana*) (CHERNYS; ZEEVAART 2000), amendoim (*Arachis hypogaea*) (WAN; LI., 2005), laranja (*Citrus sinensis*) (RODRIGO et al., 2006) e soja (WANG et al., 2013).

Em arroz, Bang et al. (2013) avaliaram três gerações dos eventos geneticamente modificados subsequentes (T₂-T₄), analisando folhas sob déficit hídrico em ensaios de microarranjos. Os autores identificaram o gene *NCED3* como seca-induzido e maiores níveis de transcritos foram evidenciados em folhas e raízes mas não em sementes e flores. A comparação dos níveis do *OsNCED3* entre T₂-T₄ não revelou alterações significativas, nem sinal de silenciamento gênico (BANG et al., 2013). A expressão, utilizando promotor estresse induzido, deste gene (*OsNCED3*) em *Arabidopsis thaliana* aumentou rapidamente o nível de ABA nas folhas, reduziu a perda relativa de água e conferiu tolerância a seca, comparado às plantas não-transformadas (HWANG et al., 2010).

Em feijão (*Phaseolus vulgaris*) sob condições de déficit hídrico, o gene *PvNCED* foi altamente induzido em níveis de RNAm e proteínas, o que precedeu o acúmulo de ABA (QIN; ZEEVAART, 1999). Em um estudo posterior, os mesmos autores inseriram o gene *PvNCED* em tabaco constitutivamente (promotor 35S) e sob o controle do promotor induzido DEX (dexametasona), e demonstraram acúmulo de ABA em ambas as condições (QIN; ZEEVAART, 2002). Folhas destacadas de tabaco GM apresentaram menor perda de água por transpiração, resultado da ativação da via biossintética de ABA promovendo fechamento estomático, fato confirmado por medidas de condutância estomática. Plantas transgênicas submetidas a sete dias de privação de água também mostraram aumento da tolerância quando comparadas às plantas não-transformadas (QIN; ZEEVAART, 2002). Resultados semelhantes foram observados para o gene *LeNCED* em tomates sob condições de déficit hídrico (BURBIDGE et al., 1999). Igualmente para feijão de

corda (*Vignaun guiculata*) foi reportado acúmulo de ABA e aumento da expressão do gene 35S:*VuNCED1* em caules e folhas de plantas com oito dias submetidas a 10h de desidratação (IUCHI et al., 2000). Em abacate (*Persea americana*), a expressão estresse induzida do gene *PaNCED1* foi significativamente maior em resposta à perda de água em folhas desidratadas a 80% (CHERNYS; ZEEVAART, 2000). Da mesma forma, em amendoim (*Arachis hypogaea*), a superexpressão de *AhNCED1* foi maior em resposta à seca (WAN; LI.,2005) em caules e folhas desidratadas por 10h, mas não em raízes (WAN; LI., 2006). Além disso, a superexpressão de *AhNCED1* em *Arabidopsis* aumentou a tolerância à seca acompanhado de acúmulo de ABA (WAN; LI.,2006) e conferiu tolerância ao estresse osmótico (WAN; LI, 2006). Em laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), a expressão estresse induzida dos genes *CsNCED1* e *CsNCED2* foi analisada em relação à resposta ao déficit hídrico em folhas e relacionada à alteração no teor de ABA. Durante um experimento de desidratação por 6h, folhas destacadas perderam 15% do conteúdo de água e, em resposta, a concentração de ABA aumentou significativamente depois de 4h de estresse, alcançando valores 18x maiores que o controle. Os transcritos de *CsNCED1* foram detectados após 2h de desidratação, precedendo o aumento de ABA. A desidratação progressiva das folhas induziu fortemente o acúmulo de mRNA de *CsNCED1*, sugerindo seu envolvimento em vias de respostas a estresses abióticos (RODRIGO et al., 2006).

De modo geral, os genes *NCED* de plantas formam uma família multigênica e apresentam expressão específica em diferentes tecidos. Tem sido demonstrado que o gene *NCED3*, em particular, desempenha um importante papel na resposta ao déficit hídrico, enquanto a contribuição de outros membros da família parece ser menor (IUCHI et al., 2001; TAN et al., 2003), embora as transcrições para outras enzimas incluindo ZEP e AAO3 mostram ser reguladas pela desidratação (ENDO et al., 2008), sugerindo que a expressão de *NCED3* tem maior contribuição para a regulação dos níveis de ABA.

Segundo Behnam et al. (2013), na região promotora do gene *AtNCED* estão presentes sequências de *cis*-elementos tais como *G-box like motif*, *Myb recognition motif* e um *ABA-responsive* elemento (*ABRE*)- *like*

sequence, aos quais se ligariam os fatores de transcrição do tipo bZIP como as *G-binding-factors* (GBFs) e/ou *basic helix-loop-helix* (bHLH), regulando a indução do gene em resposta à seca.

Altos níveis de expressão do gene *NCED3* também foram observados em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando a quinase MKK4, sugerindo que este esteja supostamente envolvido na resposta ao déficit hídrico através da regulação da atividade de MPK3 (KIM et al., 2011). A proteína MKK4 é uma MPK quinase (MKKs) que atua convertendo, na célula, os sinais extracelulares recebidos e gerados nos receptores e sensores, através de várias vias de sinalização, em respostas celulares. Em *A. thaliana*, a expressão da MKK4 resultou em maior tolerância à salinidade, bem como menores perdas de água sob condições de desidratação, demonstrando assim uma relação com a expressão do gene *NCED3* (KIM et al., 2011).

Ahrazem et al. (2012) realizaram estudos de expressão gênica em açafrão (*Crocus sativus*) e confirmaram o envolvimento das proteínas NCED em resposta ao déficit hídrico em tecidos vegetativos, demonstrando também uma correlação entre a expressão de *NCED* e o acúmulo de ABA. Recentemente, Neves et al. (2013) investigaram o acúmulo de ABA e a expressão de genes carotenóide dioxigenase (*CCD*) (*NCED2*, *NCED3*, *CCD4* e *NCED5*) em folhas e raízes do limoeiro “Rangpur” e tangerinas “Sunki” quando submetidas à condições de déficit hídrico, mostraram um aumento progressivo do acúmulo de ABA e uma maior expressão dos genes *NCED2* e *NCED5*. Por sua vez, no limoeiro foram observadas alternâncias entre alta e baixa concentração de ABA, além de uma maior expressão dos genes *NCED2*, *NCED3*, *CCD4* e *NCED5*, sendo os três primeiros mais expressos nas raízes e o último nas folhas. Os autores ressaltam a correlação entre a transcrição destes genes e o acúmulo de ABA durante o déficit hídrico, demonstrando o envolvimento dos genes *NCED* na maior *tolerância* à seca.

Em soja, Wang et al. (2013) identificou cinco clados de carotenóides oxigenases (*CCD1*, *CCD4*, *CCD7*, *CCD8a* e *NCED*), sendo que existem duas cópias do gene *NCED3*. Semelhanças encontradas na atividade catalítica destas enzimas indicam que todos os genes epoxicarotenóides em

soja encontram-se envolvidos na fisiologia de estresses abióticos e presume-se que o ABA possa regular essas moléculas.

De modo geral, a literatura mostra que a indução de genes *NCED* ocorre nos estádios iniciais de respostas ao déficit hídrico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) antecedendo o acúmulo de ABA, responsável pela ativação de vários mecanismos de defesa vegetal a restrição hídrica. O entendimento da ativação e da regulação do gene *AtNCED3* pode fornecer informações sobre os processos moleculares envolvidos nestas respostas iniciais à seca em soja. Assim, diante do cenário de mudanças climáticas e considerando-se a necessidade eminente do desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico, estudos de pesquisa básica em culturas agrícolas importantes como a soja são fundamentais a fim de se compreender a funcionalidade e o efeito de genes responsivos à seca e ao ABA, como o *NCED* em condições de escassez de água.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Introduzir a construção gênica *35S:AtNCED3* em soja e caracterizar fisiológica e molecularmente os eventos obtidos, para selecionar eventos candidatos que possam ser utilizados em experimentos futuros em condições reais de campo.

3.2 Objetivos Específicos

Obter via *Agrobacterium tumefaciens* eventos de soja geneticamente modificadas com a construção gênica *35S:AtNCED3*;

Caracterizar molecularmente os eventos obtidos quanto ao número de inserções e à expressão do transgene;

Caracterizar os níveis de expressão relativa dos genes endógenos *GmAAO3*, *GmPP2C*, *GmSnRk2* e *GmAREB1* ABA dependente e;

Caracterizar os eventos obtidos quanto às trocas gasosas, características de crescimento e componentes de rendimento sob déficit hídrico em casa de vegetação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 201-202, 2010.

AHRAZEM, O.; RUBIO-MORAGA, A.; TRAPERO, A.; GÓMEZ-GÓMEZ, L. Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, *CstNCED*, isolated from *Crocus sativus* stigmas. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 681–694, 2012.

ALVES, J. E. D. A polêmica Malthus versus Condorcet reavaliada à luz da transição demográfica. Texto para discussão da Escola Nacional de Ciências Estatísticas, ENCE/IBGE, nº4, Rio de Janeiro, 2002.

ANP-Agência Nacional de Petróleo, Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 2014

APROSOJA - Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso, Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/sobre-a-soja/Os-usos-da-Soja>> Acesso em: 2014.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cell utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycinemax* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1-6, 2000.

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M. C.; RECH, E. L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, v. 42, p. 1298-1302, 2002.

ASSAD, E.; PINTO, H. S. Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura. APOSTILA, Posigraf, São Paulo, 2008.

BANG, S. W.; PARK, S. H.; JEONG, S. J.; KIM, Y. S.; JUNG, H.; HÁ, S. H.; KIM, J. K. Characterization of the stress-inducible *OsNCED3* promoter in diferente transgenic rice organs and over three homozygous generations. **Planta**, v. 237, p. 211–224, 2013.

BARBOSA, E. G. G.; PAGLIARINI, R.F.; NEPOMUCENO, A. L. Obtenção, seleção de eventos de soja contendo o gene *AtAREB1* e análises da sinalização ABA-dependente. Dissertação UEL, Londrina – Paraná, IAPAR - EMBRAPA. 2012.

BEHNAM, B.; IUCHI, S.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; TAKASAKI, H.; OSAKABE, Y.; YAMAGUCHI, SHINOZAKI, K.; KOBAYASHI, M.; SHINOZAKI, K. Characterization of the Promoter Region of an *Arabidopsis* Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Dehydration-Inducible Transcription. **DNA Research**, p. 1–10, 2013.

BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In: Miysaka, Shiro; Medina, Júlio César. **A soja no Brasil**, Ed. 1. São Paulo, 1062 p. 1981.

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

BOUDSOCQ, M.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIERE, C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyper-osmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 41758–41766, 2004.

BOURNAY, A. S.; HEDLEY P. E.; MADDISON A.; WAUGH R.; G. C. MACHRAY. Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. **Nucl. Acids**, 1996.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **The Plant Journal**. v. 17, p. 427–431, 1999.

CHAN, Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. **Genomics**, v. 100, n. 2, p. 110-115, 2012.

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

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 drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 353, p. 299-305, 2007

CHERNY, J. T.; ZEEVAART, J. A. D. Characterization of the 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado. **Plant Physiology**, v. 124, p. 343–353, 2000.

CI SOJA – Centro de Inteligência da Soja. Disponível no site Disponível em: <<http://www.cisoja.com.br/index.php?p=historico>> Acesso em: 2014.

COLCOMBET, J.; HIRT, H. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. **Biochemical Journal**, v. 413, p. 217–226, 2008.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_bol_etim_graos_janeiro_2014.pdf> Acesso em: 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t>> Acesso em: 2015.

CUTLER, S.R.; RODRIGUES, P.L.; FINKELSTEIN, R.R.; ADAMS, R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review Plant Biology*, v. 61, p. 651-679, 2010.

DALBOSCO, Milton. Situation the model for technology transfer in the public-private partnership: Embrapa and Fundação Meridional. 2013. 34 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

DEVI R, KARU N, GUPTA A.K. Potential roles of antioxidant enzymes in depinditing drought tolerance of wheat. *Indian J Biochem Biophy* , 2011.

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*, v. 33, p.751–763, 2003.

EMBRAPA Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2013). Soja em números (safra 2010/2011). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai%42&op_page%4294> Acesso em: 2014.

EMBRAPA Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>>. Acesso em: 2015.

ENDO, A.; SAWADA, Y.; TAKAHASHI, K.; OKAMOTO, M.; IKEGAMI, K.; KOIWAI, H.; SEO, M.; TOYOMASU, T.; MITSUHASHI, W.; SHINOZAKI, K.; NAKAZONO, M.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T.; NAMBARA, E. Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology*. v. 147, p. 1984–1993, 2008.

ENGELS, C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARIN, S. R. R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; KANAMORI, N.; NEPOMUCENO, A. L. Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 556–565, 2013.

FAGERIA, N. K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. 1º ed. Brasília: Departamento de publicações. EMBRAPA-CNPAP, p.381-392, 1989.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant physiol** 150: 1750–1761, 2009.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura Disponível em: <<https://www.fao.org.br/apdsa.asp>> Acesso em: 2015.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da Soja. **Circular Técnica**, EMBRAPA, p. 1-9, 2011.

FREY, A.; EFFROY, D.; LEFEBVRE, V.; SEO, M.; PERREAU, F.; BERGER, A.; SECHET, J.; TO, A.; NORTH, H. M.; MARIO-POLL, A. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. **The Plant Journal**, v. 70, p. 501–512, 2012.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.

FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509-525, 2011.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATO, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *AREB1* Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17.p. 3470–3488, 2005.

GAO, F. H.; ZHANG, H. L.; WANG, H. G.; GAO, H.; LI, Z. C. Comparative GHASSEMIAN, M.; LUTES, J.; CHANG, H. S.; LANGEM I.; CHEN, W.; ZHU, T.; WANG, X.; LANGEM B. M.; Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2899-2911, 2008.

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

GONZALEZ-GUZMÁN. M.; APOSTOLOVA, N.; BELLÉS, J. M.; BARRERO, J. M.; PIQUERAS, P.; PIQUERAS, P.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L.; SERRANO, R.; RODRÍGUEZ, P. L. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes

the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. **Plant Cell**, v. 14, p. 1833–1846, 2002.

GHASSEMIAN, M.; LUTES, J.; CHANG, H. S.; LANGEM I.; CHEN, W.; ZHU, T.; WANG, X.; LANGEM B. M. Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2899-2911, 2008.

HEATHERLY, L. G.; ELMORE, T. W. Managing inputs for peak production. **In soybeans: improvement, production and uses**. Edited by Specht, J. E., Boerema, H. R. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, p.451-536. 2004.

HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v. 24, p. 519–570, 1973.

HUBBARD, K. E.; NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; GETZOFF, E. D.; SCHROEDER, J. I. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. **Genes & Development**, v. 24, p. 1695–1708, 2010.

HWANG, S. G.; CHEN, H. C.; HUANG, W. Y.; CHUM Y. C.; SHII, C. T.; CHENG, W. H. Ectopic expression of rice *OsNCED3* in *Arabidopsis* increases ABA level and alters leaf morphology. **Plant Science**, v. 178, p. 12-22, 2010.

INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em: <<http://www.inpe.br/>>, Acesso em: 2014.

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 Cell Physiology**, v.47, n.1, p. 141-153, 2006.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 27, p. 325–333, 2001.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerance cowpea. **Plant Physiology**, v. 123, p. 553-562, 2000.

JAGGARD, K. W.; QI, A.; OBER, E. S. Possible changes to arable crop yields by 2050. **Philosophical Transactions of Royal Society B**, v.365, p.2835-2851, 2010.

JAGLO-OTTOSEN, K. R.; GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; SCHABENBERGER, O.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* CBF1

overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science**, v. 280, p. 104-106, 1998.

JAMMES, F.; SONG, C.; SHIN, D.; MUNEMASA, S.; TAKEDA, K.; GU, D.; CHO, D.; LEE, S.; GIORDO, R.; SRITUBTIM, S.; LEONHARDIT, N.; ELLIS, B. E.; MURATA, Y.; KWAK, J. M. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 106, p. 20520–20525, 2009.

KALEFETOĞLU, T.; EKMEKÇI, Y. The effects of drought to plants and tolerance mechanisms. **Journal of Science**, v.18, p.723-740, 2005.

KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p.346-350, 2004.

KIM, T-H.; BOHMER, M.; HU, H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J. I. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 561-591, 2010.

KIM, S. H.; WOO, D. H.; KIM, J. M.; LEE, S. Y.; CHUNG, W. S.; MOON, Y. H. Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, p. 150-154, 2011.

KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, S.; MINAMI, H.; KAGAYA, Y.; HATTORI, T. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. **Plant Cell**, v. 16, p. 1163–1177, 2004.

KUDLA, J.; BATISTIČ, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **Plant Cell**, v. 22, p. 541–563, 2010.

LEFEBVRE, V.; NORTH, H.; FREY, A.; SOTTA, B.; SEO, M.; OKAMOTO, M.; NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Functional analysis of *Arabidopsis NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **Plant Journal**, v. 45, p. 309–319, 2006.

LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MAS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **EMBO J.** 2009.

LEITE, J. P.; BARBOSA, E. G. G.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F. C.; PAGLIARINI, R. F.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1Δ QT) improves soybean responses to water deficit. **Genetics and Molecular Research**, 2014.

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

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science**, v. 324, p. 1064–1068, 2009.

MANALAVAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L. S.; NGUYEN, H. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant Cell Physiology**, v. 50, p. 1260-1276, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 2014.

MARRS, K. A.; WALBOT, V. Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 93-102, 1997.

MARTINEZ-ANDUJAR, C.; ORDIZ, M. I.; HUANG, Z.; NONOGAKI, M.; BEACHY, R. N.; NONOGAKI, H. Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 108, p. 17225–17229, 2011.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1819, p. 86-96, 2012.

NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, v. 149, p. 88095, 2009.

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

NASA- National Aeronautics and Space Administration. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/vital-signs/carbon-dioxide/>>. Acesso em: 2015.

NEVES, D. M.; COELHO FILHO, M. A.; BELLETE, B. S.; SILVA, M. F. G. F.; SOUZA, D. T.; SOARES FILHO, W. dos S.; COSTA, M. G. C.; GESTERIA, A. S. Comparative study of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase and abscisic acid accumulation in the responses of *Sunki mandarin* and *Rangpur lime* to water deficit. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 5339-5349, 2013.

NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v.37, p. 1426-1434, 1997.

PARK, S. Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D. R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T. F.; ALFRED, S. E.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, N. J.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, P. L.; McCOURT, P.; ZHU, J. K.; SCHROEDER, J. I.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL Family of START proteins. **Science**, v. 22, p. 1068-1071, 2009.

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

POLIZEL, A. M.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F. A.; STOLF-MOREIRA, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.3641-3656, 2011.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; 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**, Oxford, v. 50, p. 54-69, 2007.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y. Q.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold responsive gene expression in *Zea mays* L. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, p. 1042-1052, 2004.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 15354–15361, 1999.

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

RODRIGO, M. J.; ALQUEZAR, B.; ZACARÍAS, L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 633–643, 2006.

ROLLA, A. A. D. P.; CARVALHO, J. D. F. C.; PAGLIARINI, R. F.; ENGELS, C.; RIO AD, et al. Phenotyping soybean plants transformed with *rd29A: AtDREB1A* for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgen**, 2014.

SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167-173, 2008.

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**, 2006a;

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. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 2006b.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Fisiologia das Plantas. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

SATO, A.; SATO, Y.; FUKAO, Y.; FUJIWARA, M.; UMEZAWA, T.; SHINOZAKI, K.; HIBI, T.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H.; GOTO, D. B.; UOZUMI, N. Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. **Biochemical Journal**, v. 424, p. 439–448, 2009.

SCHWARTZ, S. H.; TAN, B. C.; GAGE, D. A.; ZEEVAART, J. A.; MCCARTY, D. R. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. **Science**, v. 276, p. 1872–1874, 1997.

SCHWEIGHOFER, A.; HIRT, H.; MESKIENE, I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 236–243, 2004.

SEAB- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja_2013_14.pdf>. Acesso em: 2014.

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

SEO, M.; KOSHIBA, T. The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 41-48, 2002.

SEO, M.; PEETERS, A. J. M.; 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 Science**, v. 97, p. 12908–12913, 2000.

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing view on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.211–222, 2002.

SHEARD, L. B.; ZHENG, N. Signal advance for abscisic acid. **Nature**, v. 462, p. 575-576, 2009.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.221-227, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 918, 2013.

TAN, B. C.; JOSEPH, L. M.; DENG, W. T.; LIU, L. J.; LI, Q. B., CLINE, K.; McCARTY, D. R. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. **Plant Journal**, v. 35, p. 44–56, 2003.

TAYLOR, I. B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1563-1574, 2000.

TOH, S.; IMAMURA, A.; WATANABE, A. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1368–1385, 2008.

TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. **Advances in Agronomy**, v.71, p. 123-193, 2001.

UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; ISHIHAMA, Y.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 106, p. 17588–17593, 2009.

UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant Cell Physiology*, v. 11, p. 1821 – 1839, 2010.

USDA- United State Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>>. Acesso: 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. (2013). Soybeans: World supply and distribution. Available at Disponível em:

<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName¼Tablep07%3apSoybeans%3apWorldpSupplypandpDistribution&hidReportRetrievalID¼706&hidReportRetrievalTemplateID¼8>>. Acesso em: 2014.

VADEZ, V.; RAO, J. S.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. DREB1A promotes root development in deep soil layers and increases water extraction under water stress in groundnut. **Plant Biology**, v.15, p.45-52, 2013.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523–539, 2006.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 8588–8596, 2002.

WAN, X. R.; LI, L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea*. **DNA sequence**, v. 16, p. 217-233, 2005.

WAN, X. R.; LI, L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance in *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, o. 1030-1038, 2006.

WANG, R. K.; WANG, C. E.; FEI, Y. Y.; GAI, J. Y.; ZHAO, T. J. Genome-wide identification and transcription analysis of soybean carotenoid oxygenase genes during abiotic stress treatments. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 4737-4745, 2013.

XIONG, L.; ZHU, J. Regulation of abscisic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 29–36, 2003.

XU, D. L.; PARK, J. W.; MIRKOV, T. E. Viruses causing mosaic disease in sugar cane and their genetic diversity in Southern China. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 1031-1039, 2008.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Deydration and Cold Stresses. **Annual Review of plant Biology**. v. 57, p. 781-803, 2006.

YOSHIDA, R.; UMEZAWA, T.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals

controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 5310–5318, 2006.

YOSHIDA, T.;FUJITA, Y.; SAYAMA, H.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K. AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, v. 61, p. 672–685, 2010.

ZEEVAART, J. Abscisic acid metabolism and its regulation. In PPJ Hooykaas, MA Hall, KR Libbenga, eds, **Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones**, Elsevier Science, Amsterdam, p. 189–

CAPÍTULO 2

5 Artigo

**Obtenção e análise molecular e fisiológica de soja
contendo a construção 35S:AtNCED3 visando
tolerância à seca**

Artigo a ser submetido à revista *Plant Science*

5.1 INTRODUÇÃO

Considerando o cenário de mudanças climáticas, o desenvolvimento de plantas mais tolerantes às adversidades ambientais, como a seca, tornou-se alvo de pesquisas científicas. Assim, a obtenção de Plantas Geneticamente Modificadas (PGM), através de ferramentas de biotecnologia, possibilitará a inserção de genes que conferem tolerância ao déficit hídrico em plantas de soja, até então consideradas, de forma geral, sensíveis a prolongados períodos de seca.

O fitormônio ácido abscísico (ABA) é peça chave na regulação de uma variedade de processos do desenvolvimento vegetal, coordenando também uma complexa rede regulatória que possibilita a sobrevivência das plantas mesmo em condições de baixa disponibilidade de água (CUTLER et al., 2010; KIM et al., 2010). A sinalização do ABA em células vegetais têm sido dividido em etapas como metabolismo, e transporte de ABA, percepção e transdução de sinais que incluem receptores de ABA (RCAR) (MA et al., 2009), um grupo da proteína fosfatase tipo 2Cs (PP2Cs) (SCHWEIGHOFER et al., 2004) e os membros do grupo das quinases, a proteína quinase do tipo 2 SNF-Relacionadas (SnRK2) (UMEZAWA et al., 2009). Em geral, na presença de ABA, a formação do complexo PYR/RCAR-PP2C sequestra a fosfatase, desligando-a das quinases, permitindo assim a ativação de SnRK2, que tem como alvo canais iônicos, NADPH-oxidases e fatores de transcrição como ABF/AREB (SATO et al., 2009) e nos demais genes relacionados às respostas a estresses abióticos, induzindo sua expressão (BARBOSA et al., 2012).

Na via de biossíntese do ABA, o gene *NCED* (9-cis-epóxicarotenóide dioxigenase) codifica uma enzima chave que cliva os epoxicarotenóides C40 em xantoxina, precursores do fitormônio (IUCHI et al., 2001). O envolvimento do *NCED3* na biossíntese do ABA foi confirmado pelo aumento nos níveis de ABA em *Arabidopsis thaliana* (MARTINEZ-ANDUJAR et al., 2011) em condições de estresses abióticos, como a seca. Consistente com a importância desta regulação, o gene *NCED3* foi altamente induzido com consequente acúmulo de ABA em condições de déficit hídrico, em várias culturas economicamente importantes, tais como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (BURBIDGE et al., 1999), feijão (*Phaseolus vulgaris*)

(QIN;ZEEVAART, 1999), feijão de corda (*Vignaun guiculata*) (IUCHI *et al.*, 2000), abacate (*Persea americana*), (CHERNYS; ZEEVAART 2000), amendoim (*Arachish ypogaea*) (WAN; LI., 2005) e laranja (*Citrus sinensis*) (RODRIGO *et al.*, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que, sob certas condições, o ABA regula sua própria biossíntese e catabolismo em nível transcricional (XIONG *et al.*, 2002). Experimentos realizados por Grasseman *et al.* (2008) demonstraram uma regulação positiva mediada pelo ABA para a transcrição de zeaxantina epoxidase, aldeído oxidase e ABA hidroxilase. Neste estudo, o ABA apresentou uma forte regulação positiva na transcrição do *NCED3*. Além disso, outro estudo demonstra que houve um aumento nos níveis transcricionais das enzimas envolvidas no metabolismo do ABA, como NCED e a AAO3 quando submetidas às condições de déficit hídrico (CHAN, 2012).

Dentro destas complexas redes de interações, o envolvimento de *NCED3* na tolerância ao déficit hídrico precisa ser melhor compreendido para desenvolver estratégias mais eficientes para a geração de PMGs. A partir do conhecimento dos processos metabólicos utilizados pelas plantas para a proteção contra o estresse, os pesquisadores podem desenvolver estratégias de modificação do metabolismo vegetal visando à manutenção dos processos celulares a fim de minimizar os efeitos danosos dos estresses abióticos. (BARBOSA *et al.*, 2012).

Assim, visando atender às necessidades por cultivares de soja mais tolerantes aos períodos de déficit hídrico, o presente estudo objetivou a obtenção de plantas geneticamente modificadas com a construção gênica *35S:AtNCED3* em soja e a caracterização fisiológica e molecular inicial dos eventos obtidos, em experimentos sob déficit hídrico induzido em condições de casa de vegetação.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do cassete de expressão

O plasmídeo pMDC123-iGUS 35S:AtNCED3 foi construído, no Centro Internacional Japonês de Pesquisa de Ciências Agrícolas (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences – JIRCAS*), e repassado a Embrapa Soja via Acordo de Transferência de Material.

Este cassete contém o promotor constitutivo *CaMV 35S*, o gene de interesse *AtNCED3* (1813 bp) e uma região terminadora contendo uma sequência rica em adenina (polyA). O cassete contém ainda um gene marcador de seleção *BAR* (codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase) que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

5.2.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para transformação

O inóculo inicial (pré-inóculo) foi preparado a partir de uma colônia isolada de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 contendo a construção *35S:AtNCED3*. As células foram incubadas em 10 mL de meio YEP (10% de bacto-peptona, 5% de extrato de levedura, 5% de NaCl e 15% de Agar) suplementado com 50 µg/mL de canamicina (agrobactéria) e 50µg/mL de rifampicina (plasmídeo), e submetidas à agitação orbital em TE-421 – TECNAL, a 150 rpm, por 24h à temperatura de 28°C. Após o crescimento das bactérias, 100µL do pré-inóculo foram transferidos para um novo frasco contendo 100mL de meio YEP e incubado com agitação orbital a 28°C até atingir OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,9 (aproximadamente 24h). O inóculo foi centrifugado a 5000g por 10 min e ressuscitado em 40 mL de meio de co-cultivo líquido composto por Gamborg B5 Basal Medium1/10X (GAMBORG et al., 1968, Sigma-Aldrich); Vitamina B5 1/10X (Sigma-Aldrich); sacarose 30 g/L (Sigma-Aldrich); MES 4,62 g/L (2-(N-Morfolino); HEPES (ácido etanosulfônico sódico, Sigma-Aldrich), pH 5,4, suplementado com GA₃ 0,25 mg/L (ácido giberélico, Sigma-Aldrich) BAP 1,67 mg/L (benzilaminopurina, Sigma-Aldrich); CYS (cisteína- Sigma-Aldrich) 400 mg/L DTT 1M (ditiotrietol, Sigma-Aldrich), filtro-esterilizados e adicionados ao meio após autoclavagem.

5.2.2.1 Material vegetal e infecção dos explantes

A cultivar convencional de soja BRS 184 foi escolhida pela equipe do Programa de Melhoramento de Plantas da Embrapa Soja para ser utilizada para transformação por se tratar de uma cultivar com alto potencial produtivo, boa aceitação no mercado e facilidade de cruzamento, bem como média exigência nutricional.

O método de transformação utilizado foi descrito por Paz et al. (2006), com modificações. Assim, para desinfecção, as sementes foram dispostas em placas de Petri e mantidas por 16h em dessecador juntamente com *becker* contendo 100 mL de hipoclorito de sódio 2% e 3,5 mL de HCl 12 N (ácido clorídrico). Após a exposição ao gás, as placas foram fechadas e transferidas para uma câmara de fluxo laminar, onde permaneceram abertas por 30 min para remoção do excesso de gás. As sementes desinfetadas foram transferidas para o meio GM (meio de germinação) composto por Gamborg B5 Basal Medium 1X; Vitamina B5 1X; sacarose 30 g/L; MES 0,64 g/L; phytaagar 6,5 g/L, pH5,6 para hidratação por 16h. Após esse período, em cada semente realizou-se um corte horizontal seguido de um corte longitudinal ao longo do hilo para separação dos cotilédones. A seguir, o tegumento, uma porção do embrião e os primórdios foliares foram retirados e os explantes foram transferidos para o meio de co-cultivo contendo a *Agrobacterium tumefaciens*. Cada cotilédone foi riscado por 12 vezes com o auxílio de uma micro escova de aço inoxidável conforme método descrito por Yamada et al. (2010).

Doze explantes foram dispostos em cada placa de Petri, mantidos com a parte adaxial voltada para o meio de co-cultivo semi-sólido composto por Gamborg B5 Basal Medium 1/10X; Vitamina B5 1/10X; sacarose 30g/L; MES 4,62 g/L; phytaagar 4 g/L, suplementado BAP 1,67mg/L; GA₃ 0,25mg/L; AS 1 M, STS (Tiosulfato de sódio, 1M, 1% de DTT 1M e CYS 400 mg/L, pH 5,4 contendo uma folha de papel filtro estéril colocado para evitar o crescimento acentuado da agrobactéria. As placas permaneceram por cinco dias em câmara climatizada com fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, luminosidade de 50 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25°C e umidade relativa de 60%.

5.2.2.2 Regeneração e seleção

Os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada e transferidos para o meio MM1 (multibrotamento sem agente seletivo) com a parte aérea em contato com o meio de cultura para induzir a formação de multibrotos. O meio MM1 é composto por Gamborg B5 Basal Medium 1X; vitamina B5 1X; sacarose 30 g/L; MES 0,64 g/L ; phyta agar 7 g/L, pH 5,6 suplementado com BAP 1,67 mg/L e 0,1% de Meropene 25 mg/L, previamente filtro-esterilizados e adicionados após a autoclavagem. Os explantes permaneceram neste meio por quinze dias nas mesmas condições já citadas e após esse período foram transferidos para o meio MM2, o qual contém a mesma composição do meio MM1, porém suplementado com o agente seletivo GLU (glufosinato de amônio) 6 mg/L.

Após permanecerem no meio MM2 por quinze dias, os explantes foram cortados na base do cotilédone para exposição de novos tecidos e transferidos para o meio MA (meio de alongamento), composto por MS (Murashigue e Skoog) 1X; vitamina B5 1X; sacarose 60 g/L; MES 1,28 g/L ; phytaagar 18 g/L, pH 5,6 e suplementado com GA₃ 1mg/L, A (asparagina) 100 mg/L, P (ácido piroglutâmico) 100mg/L, IAA (ácido indol acético) 200 µg/L, TZ (trans-zeatina) 10mg/L, Meropene 50mg/L e glufosinato de amônio 12 mg/L (Figura 10).

A cada quinze dias, os explantes eram transferidos para novos meios de alongamento (MA), sendo que a cada troca de meio um novo corte era realizado, até que os novos brotos estivessem do tamanho ideal para a próxima etapa, podendo permanecer até oito semanas no meio de cultivo MA. Quando os brotos atingiram aproximadamente 3 cm de comprimento, foram cortados e colocados no meio ME (meio de enraizamento), composto por MS ½X; vitamina B5 1X, sacarose 20 g/L; MES 0,64 g/L e phytaagar 7 g/L, pH 5,6 e 25mg/L do antibiótico Meropene filtro-esterilizado foram adicionados ao meio autoclavado. Para indução do enraizamento, os brotos recém-cortados foram imersos em uma solução de IBA (ácido indol butírico 1:100 (v/v) e inseridos no meio de cultura. Os explantes alongados permaneceram em câmara climatizada com fotoperíodo de 16h:8h luz/escuro, luminosidade de 50 µmolm⁻² s⁻¹, temperatura de 25°C e umidade relativa de 60%, por uma ou duas semanas até o enraizamento.

As plântulas com raízes desenvolvidas foram gentilmente removidas do meio, as raízes lavadas em água para remover o excesso de meio e dispostas individualmente em copos plásticos contendo substrato composto por areia: vermiculita (1:1). As plântulas foram mantidas em câmara climatizada sempre sob as mesmas condições durante sete dias e em seguida transferidas para casa de vegetação. Amostras de tecido foliar foram coletadas para confirmação da inserção do transgene via PCR convencional (Figura 10).

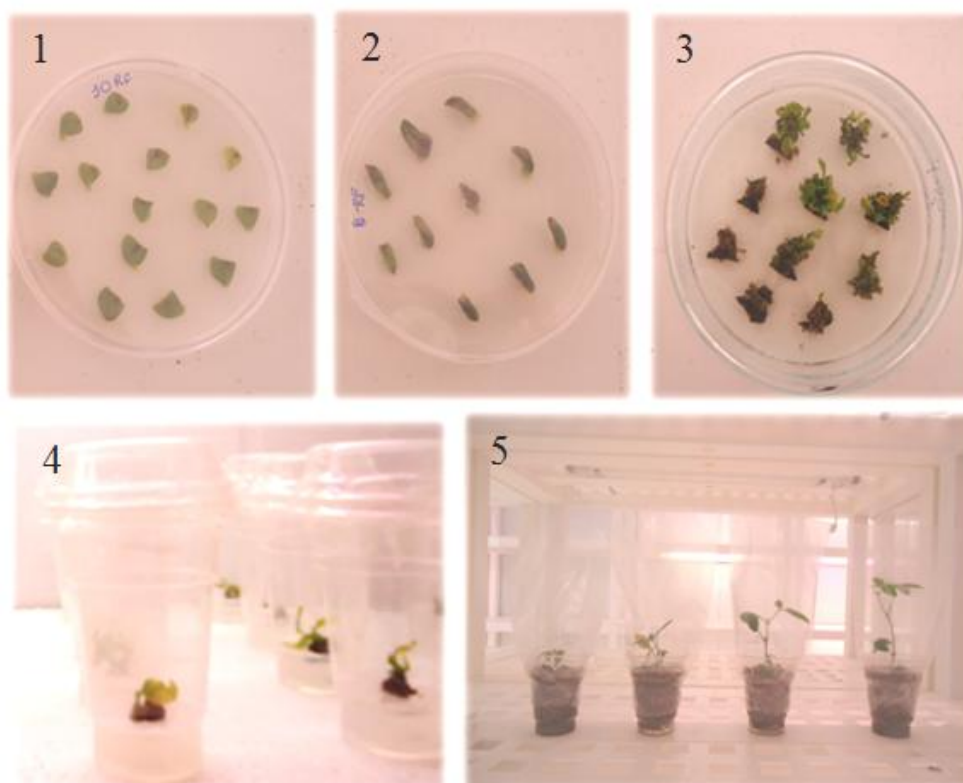


Figura 10. Trocas de meios de cultura, onde 1 e 2 SL1 (meio de multibrotamento sem agente seletivo); 3 SL2 (meio de multibrotamento com agente seletivo glufosinato); 4 meio de alongamento e enraizamento); 5 copos plásticos contendo substrato composto por areia:vermiculita (1:1).

5.2.2.3 Identificação das plantas geneticamente modificadas com a construção 35S:A μ NCED3

A amplificação por PCR convencional para confirmação de eventos positivos foi realizada utilizando-se pares de *primers* específicos

(Tabela 1) para o gene de interesse *AtNCED3* e para o gene *GUS*. O DNA genômico utilizado nas reações foi extraído do tecido foliar de acordo com o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987), com modificações.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR para confirmação de eventos positivos.

<i>Primers</i>	<i>Sequências (5'-3')</i>	<i>Tamanho do amplicon (pb)</i>
<i>AtNCED3-F</i>	TCTAGAATGGCTTCTTTCACGGCAAC	979
<i>AtNCED3-R</i>	GGATCCTCACACGCACTGCTTCGCCA	
<i>GmGUS-F</i>	CGTCCTGTAGAAACCCC	1813
<i>GmGUS-R</i>	GCGCGGTACGGTAGGAGTTG	

Inicialmente, um pequeno disco foliar de cada plântula transformada foi amostrado em microtubo de 1,5 mL ao qual adicionaram-se 100 µL de tampão de extração aquecido a 65°C, contendo 2% de CTAB, 2% de PVP, 50% de TRIS-HCl 1 M pH 8.0, 25% de EDTA 0,5 M pH 8.0 e 25% de NaCl 5 M para o preparo de 500 mL de meio de extração. O tecido foi macerado com auxílio de microesferas de alumínio, solubilizado neste meio e submetido à agitação em vórtex à temperatura ambiente, por 5 min. Posteriormente, a solução foi incubada por 30 min, à 65°C. A seguir, 300µL de clorofórmio foram adicionados e a solução foi gentilmente agitada por suaves inversões durante 5 min. Após centrifugação a 14000g, por 5 min, o sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado 300µL de isopropanol a 4°C. A solução foi agitada por inversão por 1 min e depois mantida à temperatura ambiente por 2 min. Após nova centrifugação a 14000g, por 5 min, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não remover o *pellet*. Posteriormente, foram adicionados 200µL de etanol 70% gelado e centrifugou-se a solução a 14000g, por 5min. Novamente o sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre papel absorvente para secagem do *pellet* por aproximadamente 20 min. O *pellet* foi então ressuscitado em 40µL de TE (tampão de extração - Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 40 µg/mL de RNase. Após este procedimento, a solução foi incubada por 30 min, a 37°C e em seguida armazenada a 4°C.

Para verificação da integridade do DNA genômico extraído, 5µL de DNA foram aplicados em gel de agarose 1% (p/v) contendo 1µg/mL de

brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Após a corrida eletroforética realizada a 120 volts por 40 min, as bandas de DNA íntegro foram visualizadas por exposição à luz UV.

A reação de PCR convencional foi composta de tampão de reação 1X (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), dNTP's 0,2 mM (Invitrogen), primer F 1 µM, primer R 1 µM, Taq DNA polímerase 1U, DNA genômico 50 ng/µl e água Milli-Q em um volume final de 25µl. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos), com programação composta por um período inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s, e por fim um período de polimerização a 72°C por 5 min. Em seguida, os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) com coloração por brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 1989). As bandas de DNA separadas eletroforicamente foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Polaroid MP4+ System™ (Sigma, St. Louis, MA, USA).

5.2.3 Análise de segregação de transgenes

Para a realização do teste de segregação ou zigosidade, discos foliares dos eventos na geração T₂ foram coletadas em nitrogênio líquido e o DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) modificado. Em seguida, o material foi analisado via PCR convencional conforme descrito no item anterior para confirmação do transgene, o qual foi identificado através da presença ou ausência de bandas específicas no gel de agarose 1 % (p/v) como descrito anteriormente. O teste do Qui-quadrado (X²) (p≤0.05) foi realizado para verificar se o gene exógeno AtNCED3 apresentava segregação mendeliana.

5.2.4 Quantificação da expressão gênica relativa utilizando o método 2^{-ΔΔCt}

5.2.4.1 Extração de RNA Total

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen). Inicialmente, 100 mg do tecido foliar foi pulverizado com

duas microesferas de alumínio em tubo de 1,5 mL sob nitrogênio líquido e então foi adicionado 1 mL de Trizol[®] (Invitrogen). A solução foi homogeneizada em vórtex durante 5 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12000g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual adicionaram-se 250 µL de solução salina (0,8M citrato de sódio; 1,2M NaCl) e 250 µL de isopropanol. Homogeneizou-se novamente a solução em vórtex por 5 min à temperatura ambiente e uma nova centrifugação foi realizada a 12000g, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1mL de etanol 75% adicionado. A seguir, centrifugou-se a solução a 12000g, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a vácuo por 3 min. Foram adicionados 100 µL de água livre de RNase (Invitrogen) e o *pellet* ressuspenso. Logo em seguida, adicionaram-se 10 µL de acetato de sódio (3M) e 250 µL de etanol 100%. A solução foi homogeneizada em vórtex por 15s e a seguir homogeneizada em agitador mecânico por 5 min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas à 12000g, por 15 min, a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 400 µL de etanol 75% e as amostras foram centrifugadas a 12000g, por 15 min, a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi removido e o *pellet* seco a vácuo por 3 min. Em seguida, 20 µL de água livre de RNase (Invitrogen) foram adicionados, o *pellet* ressuspenso e o RNA total armazenado em freezer a -80°C.

5.2.4.2 Tratamento com DNase

O RNA total extraído das amostras da geração T₂ foi tratado com DNase para retirada de possível DNA genômico utilizando-se o *Kit DNase I* (Invitrogen). A solução foi composta por 10 µg/µl de RNA total, tampão de reação 1X e 1 U DNase (Invitrogen) em um volume final de 25 µL completado com água livre de RNase (Invitrogen). A solução permaneceu à temperatura ambiente por 7,5 min e então foi adicionado 2,5 nM EDTA e incubou-se a solução à 65°C, por 5 min. Para verificar a presença de DNA genômico, as amostras de RNA total foram amplificadas via PCR convencional com *primers* para o gene da β -actina intron. As amostras contendo apenas RNA não apresentaram produto de amplificação.

5.2.4.3 Síntese de cDNA

Para a síntese dos cDNAs, foram utilizados aproximadamente 200 ng de RNA tratado com DNase e o *kit Super Script III* (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante.

5.2.4.4 Desenho de *primers* para técnica de RT-qPCR

As sequências gênicas utilizadas para o desenho dos *primers* foram obtidas no banco de dados Phytozome. A sequência CDS (sequência codificante) do transgene *AtNCED3* foi obtida do plasmídio utilizado para transformação e confirmada no banco de dados de *Arabidopsis thaliana* (Phytozome). Esta sequência e sequências de *NCED3* de soja (Glyma15g40070.1, Glyma05g27250.1, Glyma08g10190.1) foram alinhadas CLUSTALW e o par de *primers* desenhado em uma região específica da *A. thaliana*, visando assegurar que quaisquer diferenças observadas na expressão gênica e na quantificação do número de cópias não resultariam da expressão do gene *GmNCED3* endógenos da própria soja. O *primer* para o gene *GmAAO3* foi desenhado na região específica do *Glyma14g04950*.

Para o desenho de *primers* para o gene *GmAREB1*, sequências de soja (*Glyma04g04170*; *Glyma07g33600*; *Glyma02g14880*) foram alinhadas e os *primers* obtidos a partir de uma região comum aos três Glymas. Os *primers* para o gene *GmPP2C* (*Glyma14g37480*) e *GmSnRK2* (*Glyma02g15330*) foram desenhados por Barbosa et al., (2012) O gene normalizador *Gm β -actina* foi validado por Stolf-Moreira e colaboradores (2011) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências de *primers* dos genes *AtNCED3*, *GmAAO3*, *GmAREB1*, *GmSnRK2*, *GmPP2C* e *Gm β -actina* utilizados para análise de expressão gênica relativa por RT-PCR.

Primers	Sequências (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
AtNCED3-F	CAAGTTCAGATCACTCCCAA	129
AtNCED3-R	GCTTAAAGCGAAGAGTTCAC	
GmAAO3-F	ACACTACTTTGCAGCATACA	142
GmAAO3-R	CACACATTCCAGGAGTACAA	
GmAREB1-F	AATAGAGAATCAGCTGCGAG	80
GmAREB1-R	GCTGAGGTTGCAAACTTAA	
GmPP2C-F	GCTATGTTGATTTATGCCGTGGTG	115
GmPP2C-R	ACTTTGGTCTCAGGCTCTGCTGTCA	
GmSnRK2-F	CAAAGTGATCTCATGGATGGGA	205
GmSnRK2-R	TGCTATCTAAGTCAAGGTCAGGATC	

Gm β -actina-F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	118
Gm β -actina-R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	

O programa disponível online *Primer3plus* ([www.http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi](http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi)) foi utilizado para o desenho dos *primers*. A melhor temperatura de reação para cada par de oligonucleotídeo (*primer*) foi determinada e avaliada pela qualidade de amplificação. Para a determinação da eficiência dos *primers* foi feita uma diluição seriada 1:5 a partir de um *bulk* (mistura) composto pelos cDNAs das amostras provenientes de plantas geneticamente modificadas com a construção *35S:AtNCED*. Uma curva de dissociação para se verificar a ocorrência de formação de dímeros de *primers* e/ou amplificação de produtos inespecíficos também foi realizada.

As reações de PCR quantitativo foram conduzidas em equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o kit *Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR Super Mix-UDG with ROX* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As reações foram composta por 4 estágios, um período inicial de 50°C por 2 min seguido de 95°C por 10 min, o segundo estágio composto por 40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 1 min, 95°C por 15s, 60°C por 15s e por fim um período de 95°C por 15s.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada por quantificação relativa utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para cada tratamento, detectou-se o valor de Ct para ambos, genes alvos e normalizador (*Gm β -actina*). Para normalizar a reação, o valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do controle endógeno, obtendo-se o valor de ΔCt . Em seguida, o valor ΔCt dos tratamentos foi subtraído do valor do ΔCt da amostra calibradora (condição controle), resultando no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi utilizado na fórmula, $x^{(-\Delta\Delta Ct)}$ onde x representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno *Gm β -actina* (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Neste estudo, a condição controle (irrigada) foi utilizada como calibrador para sua respectiva condição de déficit hídrico. Para as análises estatísticas foi aplicado o teste T ($p \leq 0,05$).

5.2.5 Quantificação absoluta do número de cópias do transgene *AtNCED3* utilizando o método $2^{-\Delta Ct/2}$

Para a análise do número de cópias inseridas, o gene endógeno da lectina (*GmLectina*, 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 (FINER et al., 1996). As reações de PCR quantitativo para detectar o número de cópias do gene inserido foram realizadas utilizando o sistema de detecção *SYBR Green*[®], conforme instruções do fabricante (GIULIETTI et al., 2001). A reação foi composta por 4 estágios, um período inicial de 50°C por 2 min seguido de 95°C por 10 min, o segundo estágio composto por 40 ciclos a 95°C por 15s, 60°C por 1 min, 95°C por 15s, 60°C por 15s e por fim um período de 95°C por 15s. Os *primers* utilizados nesta etapa estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências de *primers* dos genes *AtNCED3* e *GmLectina* utilizados para análise de expressão gênica absoluta por RT-qPCR.

<i>Primers</i>	Sequências (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>AtNCED3-F</i>	CAAGTTCAGATCACTCCCAA	129
<i>AtNCED3-R</i>	GCTTAAAGCGAAGAGTTCAC	
<i>GmLectina-F</i>	TCCCGAGTGGGTGAGGATAG	85
<i>GmLectina-R</i>	CATGCGATTCCCCAGGTATG	

O método $2^{-\Delta Ct/2}$ foi utilizado na quantificação do número de cópias do transgene, onde o ΔCt é calculado pela diferença entre o valor de Ct do gene alvo pelo Ct do gene referência para o cálculo do número de cópias da geração T₁ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; BARBOSA, 2012; ENGELS, 2013).

5.2.6 Experimentos para avaliação molecular e fisiológica das PGMs contendo a construção *35S:AtNCED3*

5.2.6.1 Delineamento e montagem dos experimentos – procedimento padrão

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com os tratamentos em esquema fatorial 3x2x2 (três materiais vegetais - evento 2Ha

11 e as cultivares BRS 184 (isolinha) e BR 16 x duas condições hídricas – (controle e déficit hídrico) e 2 épocas de coleta (antes e após indução do DH) com 9 blocos para o experimento de rendimento, 6 blocos para o experimento de crescimento. As sementes foram tratadas com carboxin + thiram (200 g L⁻¹) e fipronil (250 g L⁻¹) e mantidos na câmara por 5 dias. A seguir, foram germinadas em papel de germinação em câmara de crescimento a 25°C ± 1 e 100% de umidade relativa.

No dia do plantio, foram utilizadas nos experimentos somente sementes germinadas com o comprimento de radícula uniforme, inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* (Atmo[®]), 5,0x10⁹ UFC/mL. Em seguida, as sementes germinadas foram plantadas em vasos plásticos de 1L forrados com 3 lâminas de papel filtro e contendo 1.200 g da mistura substrato:areia (1:1 volume/volume), sendo o substrato constituído pela mistura terra:areia:composto orgânico (3:2:2), de modo que o substrato e a areia foram previamente esterilizados e secos separadamente em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 3 dias.

Nos primeiros 15-25 dias após plantio, as plântulas receberam luz suplementar com fotoperíodo de 15h diárias de luz, a fim de se evitar o florescimento precoce. Cada vaso conteve uma única plântula. A temperatura da casa de vegetação foi mantida a 28±2°C, com registros de temperatura e umidade relativa a cada 5 min por meio de termohigrógrafo (Hobo U14-002, Onset[®]).

Quando as plantas atingiram o estágio V1 (Fehr et al., 1971), as positivas foram identificadas via PCR convencional e mantidas a 100% da capacidade de campo até atingirem o estágio V4. A manutenção da capacidade de campo a 100% foi obtida pela irrigação duas vezes ao dia (no início da manhã e ao final da tarde) com volume fixo de água suficiente para saturar a mistura presente nos vasos. No estágio V4 e um dia antes da indução do DH, os vasos foram saturados com água ao final da tarde e na manhã seguinte foram cobertos com sacos plásticos para prevenir a perda de água por evaporação da mistura substrato:areia. O caule das plantas foi envolto com algodão a fim de se amenizar a perda de água por evaporação pela região central do vaso. A partir deste momento, a irrigação foi suspensa nos vasos

pertencentes ao grupo déficit hídrico (DH), enquanto os vasos do grupo controle (C) permaneceram a 100% da capacidade de campo.

Foi realizada a checagem diária da condutância estomática (g_s), com base na qual a condição de déficit hídrico das plantas foi confirmada. Desta forma, a condição controle correspondeu a valores de condutância estomática acima de $0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto valores abaixo de $0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ corresponderam para as plantas em déficit hídrico, conforme Flexas et al. (2004) e Salinet et al. (2009). As medições foram realizadas por meio de um analisador portátil de fotossíntese modelo LCpro-SD (ADC BioScientific) e realizadas no interior da casa de vegetação entre 9 e 11h, em condições de céu aberto, estabelecendo-se a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

5.2.6.2 Experimento para análise molecular e trocas gasosas

Para a análise de expressão dos genes *AtNCED3*, *GmAAO3*, *GmAREB1*, *GmPP2c* e *GmSnrK2*, amostras do evento *AtNCED3* 2Ha 11 e de plantas convencionais BRS 184 e BR 16, sob DH e C foram coletadas. Os terceiros trifólios completamente expandidos, foram embalados em papel alumínio, rapidamente mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento das análises moleculares (RT-qPCR; PCR convencional).

Após a coleta, amostras de substrato foram coletadas e armazenadas em potes de alumínio previamente pesados, os quais foram devidamente vedados com fita apropriada antes de serem levados ao laboratório. Este material foi utilizado para determinação do potencial hídrico por meio de um potenciômetro modelo WP4C (Decagon).

As trocas gasosas, incluindo-se a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E) e a concentração intercelular de CO_2 (C_i), foram medidas no evento *AtNCED3* 2Ha 11 e convencionais BRS 184 e BR 16, no folíolo central do terceiro trifólio (sentido ápice-base) completamente expandido por meio de um analisador portátil de fotossíntese (LCpro-SD, ADC BioScientific). As medições foram realizadas no interior da casa de vegetação entre 9 e 11h e em condições de céu aberto, estabelecendo-se a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$

s⁻¹. Pela razão entre A e Gs foi calculada a eficiência intrínseca do uso de água (EIUA).

5.2.6.3 Experimento para parâmetros de rendimento

Após a coleta dos trifólios e do substrato, todas as plantas foram transferidas para vasos maiores (8L) previamente preenchidos com terra esterilizada. Cada vaso conteve uma única planta e todos os vasos foram mantidos bem-irrigados por meio de sistema automático de irrigação até o final do ciclo, quando então foram avaliados componentes de rendimento tais como número de vagens com sementes por planta (NVCS), número de vagens sem sementes por planta (NVSS), massa seca total de sementes (MSTS, g), número total de sementes (NTS), número de sementes por vagem (NSV) e peso de mil sementes (P1000, g).

5.2.6.4 Experimento para análise de crescimento

A análise de crescimento das plantas no evento *AtNCED3* 2Ha 11 e convencionais BRS 184 e BR 16 foi realizada inicialmente pela contagem do número de nós (NNOS), altura de planta (cm), comprimento médio de internós e medição da área foliar total (dm²) pelo equipamento LI-3100C. Em seguida, os diferentes tecidos coletados (raízes, caules mais pecíolos e lâminas foliares) foram armazenados separadamente em sacos de papel e secos em estufa a 60°C para obtenção de matéria seca constante. A massa seca total correspondeu à soma das massas secas dos diferentes tecidos em cada unidade amostral.

Também foram calculadas a taxa de crescimento relativo (TCR, g dia⁻¹) e a TCR em altura (%). Estes dados foram coletados no dia da indução do déficit hídrico e após o tratamento. A TCR em altura (%) foi calculada a partir da equação: $(H_2 - H_1) / H_1 \times 100\%$, onde H1 representa a altura no dia de indução do déficit hídrico, enquanto H2 corresponde à altura medida nos dias das coletas, que foram antes e depois da indução do DH. A TCR, g dia⁻¹ foi obtida pela fórmula $TCR = (\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1)$, em que P₁ e P₂ referem-se às massas secas de duas amostragens sucessivas (t₁ e t₂).

A umidade gravimétrica (UG, %) do substrato tanto das plantas controle (C) quanto daquelas sob déficit hídrico (DH) foi obtida a partir da

equação $UG (\%) = 100 * [(PL + MSU) - (PL + MSS) / (PL + MSS) - PL]$, onde: PL = peso do vaso (g); MSU = massa de substrato úmido (g); MSS: massa de substrato seco (g), sendo esta última obtida após secagem do substrato a 110°C.

5.2.7 Análise estatística

Os resíduos apresentaram distribuição normal e atenderam aos demais pressupostos da análise de variância (ANOVA). Desta forma, os dados de trocas gasosas, crescimento e rendimento foram submetidos à ANOVA e às comparações múltiplas de médias realizadas pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Os dados moleculares de expressão gênica foram submetidos a teste T ($p \leq 0.05$).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Identificação de eventos positivos para o gene *AtNCED3*

Um total de 184 explantes de soja convencional BRS 184 foram inoculadas com *Agrobacterium*, permitindo a construção 35S:*AtNCED3*. Destes, 2 eventos foram obtidos e identificadas como 2Ha 11 e 2Ha 13, com uma eficiência de transformação de 1,1 %. O cálculo de eficiência utilizado foi obtido pelo número de plantas positivas x 100/ número total de explantes transformados .

O tecido foliar das plantas das gerações T₀ e T₁ foi coletado e testado para o transgene como descrito na Tabela 4. Na geração T₁, 7 plantas foram identificadas como positivas, sendo 5 do evento 2Ha 11 e 1 do evento 2Ha 13, pois o evento 2Ha 13-51 apresentou contaminação na amostra, o que foi confirmado pelos dados de RT-qPCR para número de cópias (Figura 11).

Tabela 4. Gerações T₀ e T₁ 35S:*AtNCED3*. O evento 2Ha 11 gerou as plantas 02, 03, 04, 05 e 06, e o evento 2Ha 13 gerou as plantas 51 e 52.

Eventos T ₀	Eventos T ₁
	02
	03
2Ha 11	04
	05
	06
2Ha 13	51
	52

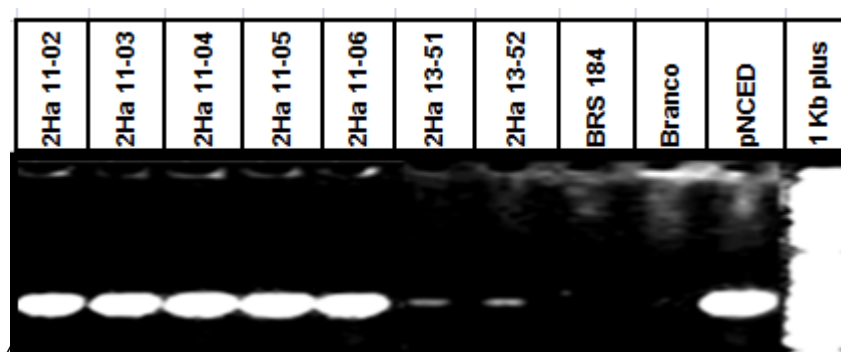


Figura 11. PCR convencional dos eventos na geração T₁ de soja identificadas como positivas para a construção gênica 35S:*AtNCED3*. As amostras foram amplificadas com o par de *primers* para o gene *NCED3* que se anela nas extremidades do gene exógeno amplificando-o integralmente (1813 pb). Legendas: 2Ha 11; 2Ha 13 - eventos transgênicos T₁ 35S:*AtNCED3*; Branco; BRS 184 (controle negativo); *pNCED* (plasmídeo contendo o transgene *AtNCED3*) utilizado como controle positivo; *ladder* 1 Kb Plus nas extremidades do gel (1% de agarose).

5.3.2 Análise de segregação dos transgenes e número de cópias

A análise de segregação e o número de cópias do gene *AtNCED3* nos eventos foi realizada na geração T₂ (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de segregação na geração T₂ para a construção 35S:*AtNCED3* com χ^2 ($p \leq 0.05$). S: Sim. N: Não.

Fenótipo	Positiva	Negativa	χ^2	Segregação 3:1	Cópias
2Ha 11-02	95	24	1,48	S	1-2
2Ha 11-03	71	24	0,00	S	1
2Ha 11-04	182	57	0,18	S	3-4
2Ha 11-05	5	1	0,06	S	1
2Ha 11-06	22	8	0,01	S	1
2Ha 13-51	-	291	-	N	-
2Ha 13-52	1	46	-	N	1

O evento 2Ha 11 apresentou toda linhagem irmã (02; 03;04;05;06) com segregação mendeliana, já o evento 2Ha 13-51 teve apenas uma planta com a inserção do gene *AtNCED3* e 46 plantas sem a presença do gene apresentando segregação não-mendeliana, enquanto o evento 2Ha 13-52 não apresentou a presença do transgene, nas plantas da geração T₂. Por estes motivos, ambos foram descartados dos próximos experimentos.

Os resultados da quantificação do número de cópias mostraram que as plantas da geração T₁ do evento 2Ha 11 apresentaram entre 1 a 4 cópias inseridas do transgene, enquanto que no evento 2 Ha 13-51 a presença de cópias do transgene não foi detectada, indicando que o gene não foi transmitido da geração T₀ para T₁. Por sua vez, o evento 2Ha 13-52 apresentou 1 cópia do transgene mas não apresentou segregação mendeliana na geração T₂ (Tabela 5).

5.3.3 Análises fisiológicas e moleculares em plantas GMs e cultivares convencionais em condições de déficit hídrico

Na condição controle (C), não houve diferença na condutância estomática (*g*s), concentração intercelular de CO₂ (*C*_i), taxa fotossintética (*A*) e taxa transpiratória (*E*) entre o evento 2Ha 11 e as cultivares convencionais BRS 184 (isolinha) e BR 16 (sensível à seca). Sob DH, o evento *AtNCED3* 2Ha 11

apresentou menores valores de trocas gasosas comparado à condição controle, o que não ocorreu com as cultivares convencionais. O evento 2Ha 11 apresentou ainda maior eficiência do uso da água (A/G_s) sob DH comparada com as cultivares não transformadas (Figura 12).

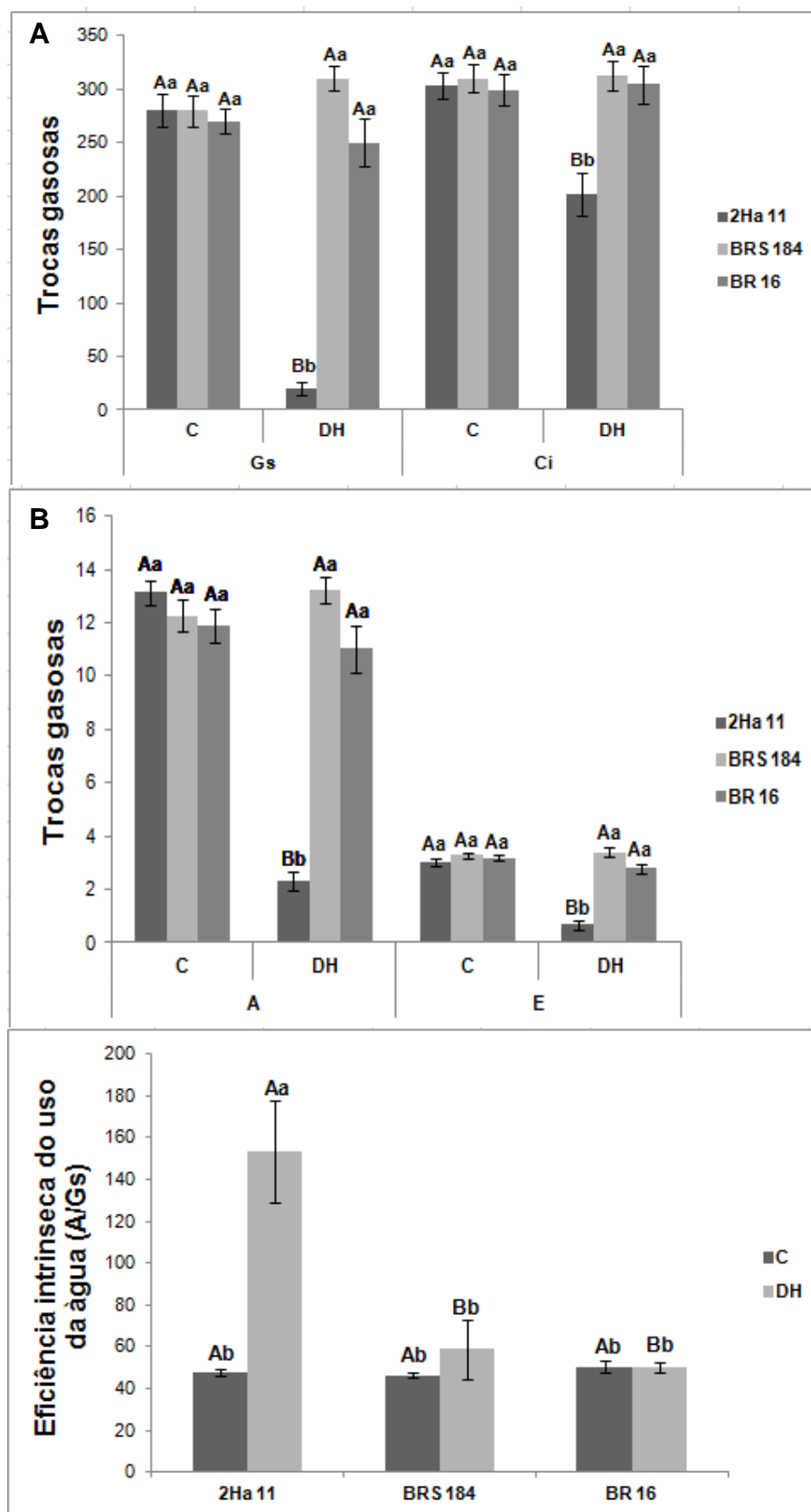


Figura 12. Trocas gasosas das plantas de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico e irrigação contínua (controle). **A.** Taxa fotossintética (*A*), Taxa transpiratória (*E*) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **B.** Condutância estomática (*G_s*) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Concentração intracelular de CO_2

(C_i) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$); C. Eficiência intrínseca do uso de água (%). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de nove blocos.

O substrato do evento 2Ha 11 apresentou menor umidade gravimétrica (UG) comparado às cultivares convencionais na condição C. Sob DH, não houve diferença na UG do substrato entre o evento transgênico e as cultivares convencionais, embora todos os materiais vegetais tenham apresentado redução da UG sob DH (Figura 13).

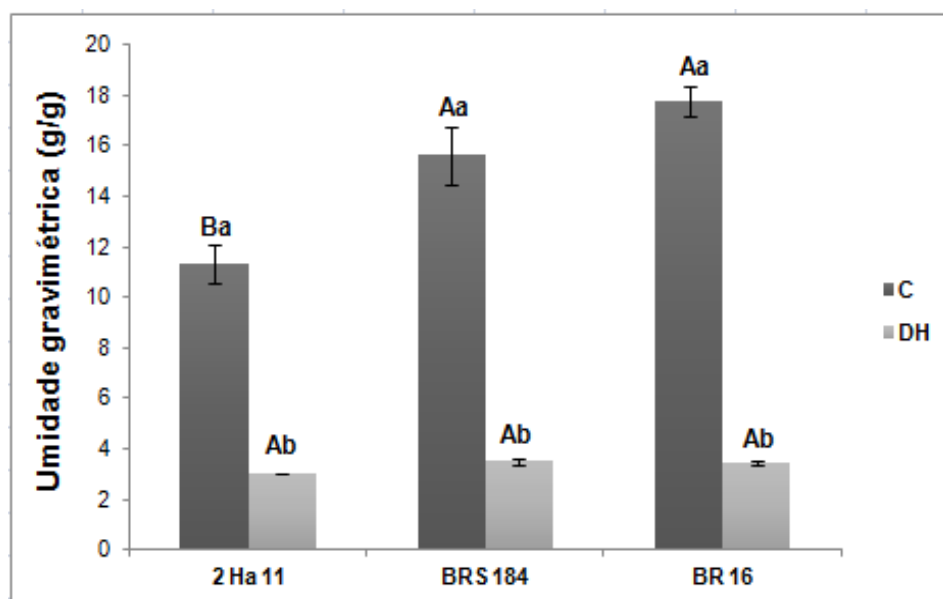


Figura 13 Avaliação do substrato dos vasos de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico (DH) e irrigação (C). O parâmetro avaliado foi a Umidade gravimétrica do solo (UG). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de seis blocos.

Com relação às massas secas e às TCRs, não houve interação significativa entre os materiais vegetais e as condições hídricas. Desta forma, considerando-se as médias de ambas as condições hídricas em cada material vegetal, não se observou diferença na massa seca de raiz (MSR) entre o evento 2Ha 11 e sua isolinha BRS 184, enquanto menores valores foram observados para a cultivar BR 16, sensível à seca. Além disso, o evento 2Ha 11 apresentou maior massa seca foliar (MSF), massa seca de caules e pecíolos (MSC) e massa seca total (MST) comparado às cultivares convencionais. O evento 2Ha 11 também apresentou maior TCR em gramas por dia (TCRg/dia) comparado às cultivares convencionais, enquanto a TCR

em altura (%) foi igual à de sua isolinha BRS 184, porém maior que a da cultivar BR 16 (Figura 14).

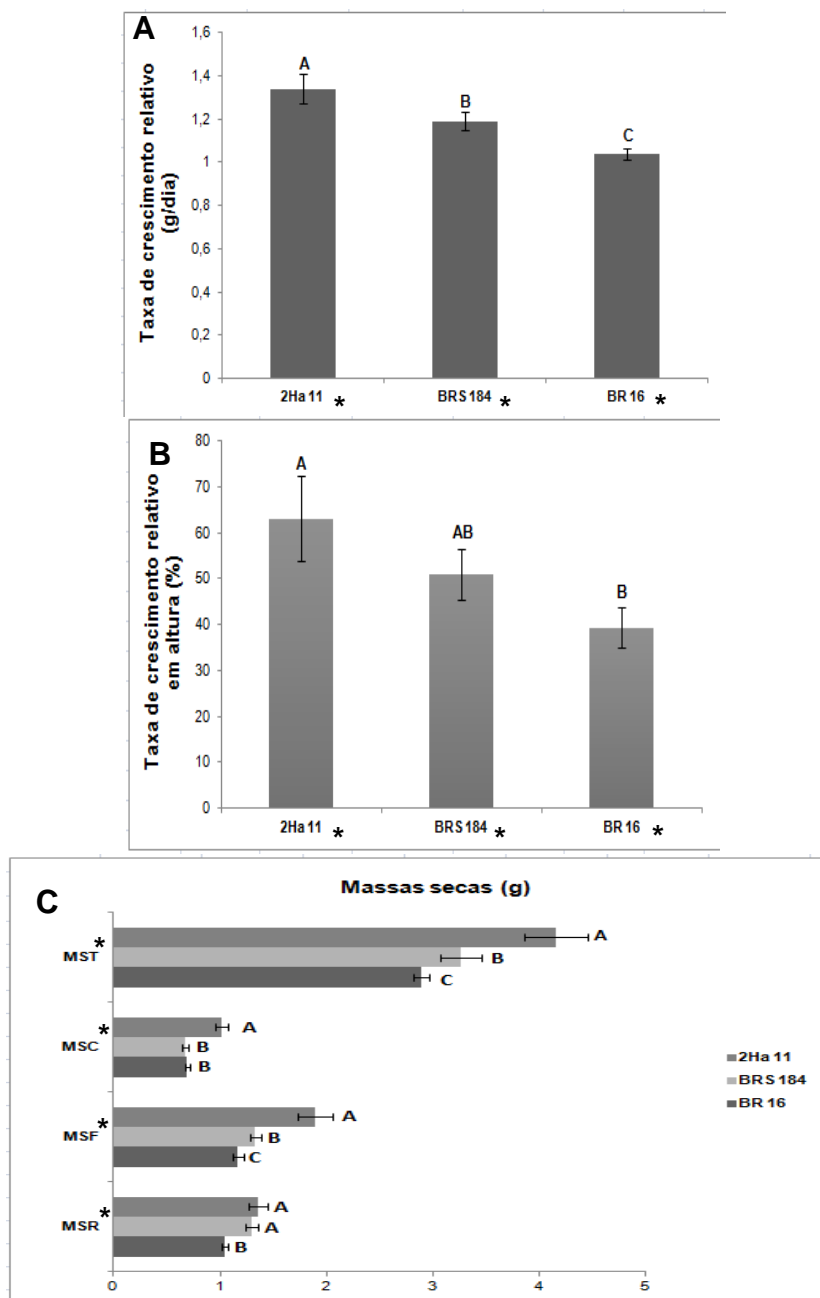


Figura 14. Parâmetros de crescimento: **A.** Taxa de crescimento (TCRg/dia), **B.** Taxa de crescimento relativo em altura (TCRalt) **C.** Massas secas: Massa seca da raiz (MSR), Massa seca foliar (MSF), Massa seca de caules mais pecíolos (MSC), Massa seca total (MST). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de doze blocos. Legenda: * não houve interação genótipo e condição hídrica.

O número de nós (NNOS) e a área foliar (AF) foram maiores no evento GM 2Ha 11 comparado às cultivares convencionais. O evento transgênico também apresentou menor comprimento médio de internós (CMI)

comparado ao sua isolinha BRS 184, porém semelhante à cultivar BR 16. Quanto à altura (ALT), o evento GM mostrou-se menor que sua isolinha BRS 184 e maior que a cultivar BR 16 (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros de Crescimento: Número de nós (NNOS); Comprimento médio interno (CMI); Altura (ALT); Área foliar (AF). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de doze blocos. Legenda: * não houve interação genótipo e condição hídrica.

	NNOS*	CMI*	ALT*	AF*
2Ha 11	8,0 \pm 0,3 A	1,98 \pm 0,1 B	15,45 \pm 0,9 B	487,7 \pm 51,3 A
BRS 184	7,5 \pm 0,2 B	2,43 \pm 0,1 A	17,75 \pm 0,7 A	349,8 \pm 16,4 B
BR 16	6,2 \pm 0,3 C	2,12 \pm 0,1 B	12,65 \pm 0,4 C	338,5 \pm 27,1 B

Com relação aos parâmetros de rendimento, o evento GM 2Ha 11 e as cultivares convencionais apresentaram mesmo número de sementes por vagem (NSV) e peso de 1000 sementes (P1000). Com relação à massa seca total de sementes (MSTS), o evento transgênico apresentou massa igual a sua isolinha BRS 184 e maior que a cultivar BR 16. O evento transgênico também apresentou maior número de vagens sem sementes (NVSS) comparado à cultivar BR 16, não apresentando diferença em relação a cultivar BRS 184. O evento 2Ha 11 apresentou ainda maior número de vagens com semente (NVCS) e número total de sementes (NTS) comparado às cultivares convencionais em ambas as condições hídricas. Somente o evento sofreu alteração no DH comparado a condição controle, apresentando aumento no NVCS e NTS (Figura15).

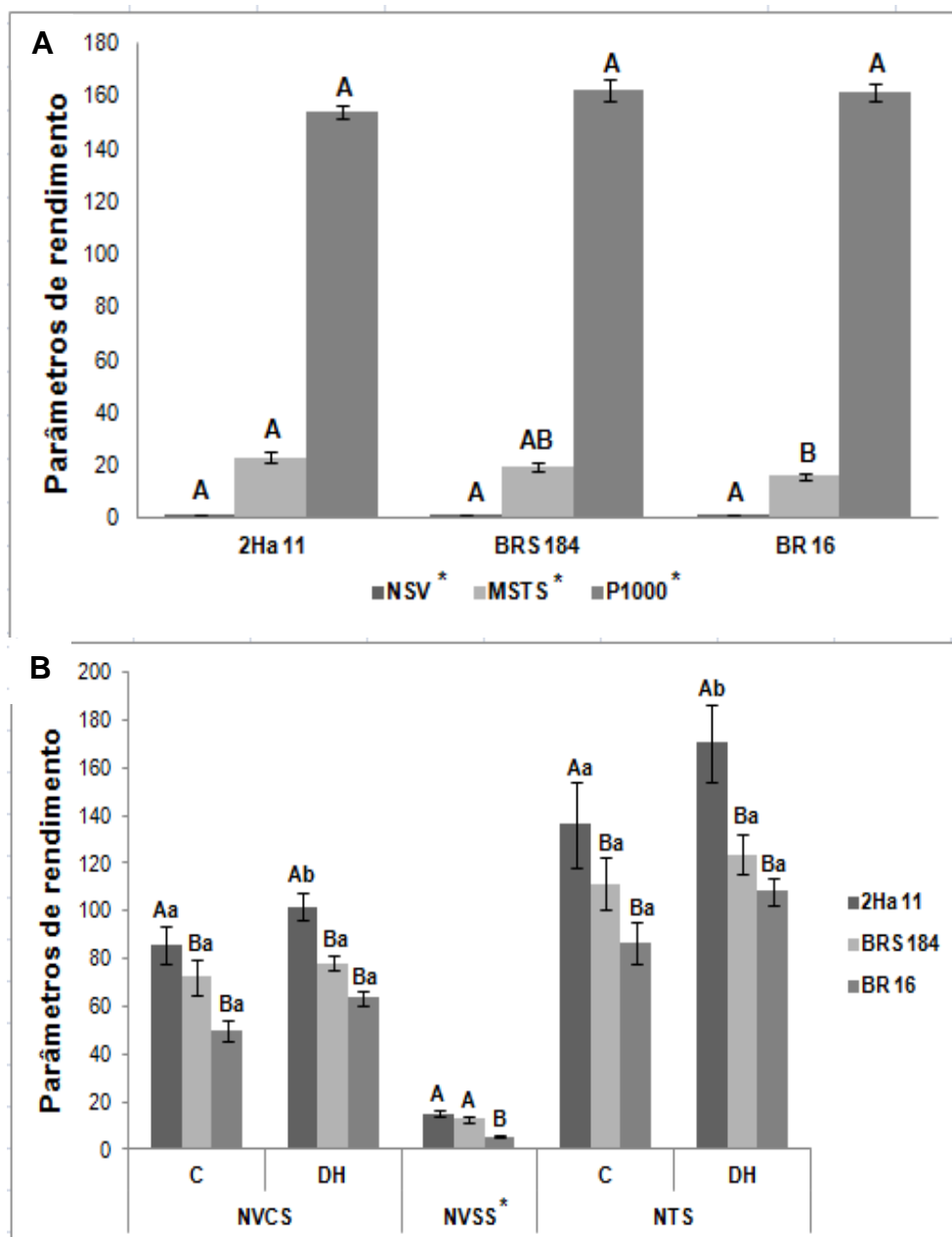


Figura 15. Parâmetros de rendimento das plantas de soja GM 2Ha 11 e das cultivares convencionais BRS 184 e BR 16 sob condições de déficit hídrico e irrigação. Os parâmetros avaliados foram: **A.** Número de sementes por vagem (NSV); Matéria seca total de sementes (MSTs); Peso de mil sementes (P1000); **B.** Número de vagens com sementes (NVCS); Número de vagens sem sementes (NVSS); Número total de sementes (NTS). Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de nove blocos. Legenda: * não houve interação genótipo e condição hídrica.

Os resultados de quantificação da expressão gênica relativa do transgene *AtNCED3* e dos genes endógenos, *GmAAO3*, *GmPP2C*, *GmSnRK2* e *GmAREB1*, mostraram que o evento 2Ha 11 apresentou maiores níveis de expressão de todos os genes avaliados quando comparado às cultivares

convencionais de soja BRS 184 e BR 16, sob DH. O calibrador utilizado foi a condição controle de cada evento comparado à condição de DH. O transgene *AtNCED3* somente foi expresso no evento transgênico 2Ha 11 e foi aproximadamente 2,4 vezes maior sob DH quando comparado à condição controle (Figura 16).

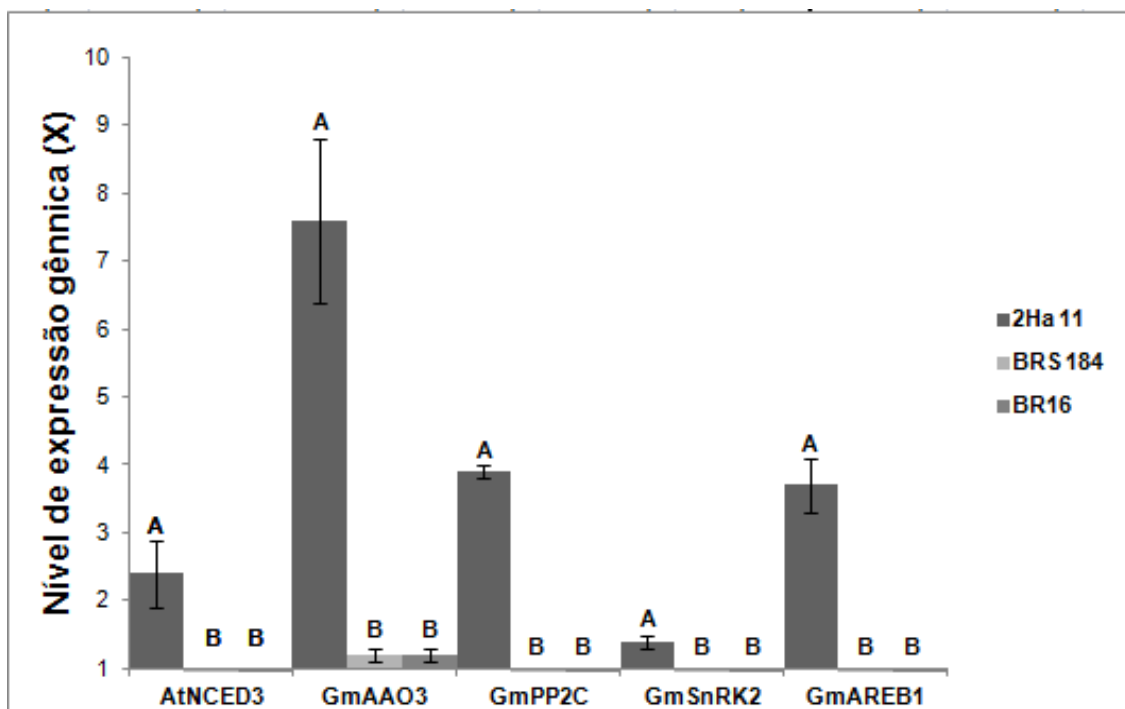


Figura 16. Expressão gênica relativa do transgene *AtNCED3* e dos genes endógenos *GmNCED3*; *GmAAO3*; *GmPP2C*; *GmSnRK2*; *GmAREB1* no evento GM 2Ha 11 e nas cultivares convencionais de soja BRS 184 e BR 16. Letras maiúsculas comparam os materiais vegetais e letras minúsculas comparam as condições hídricas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste T ($p \leq 0.05$). Valores representam médias \pm erro padrão de nove blocos.

5.4. DISCUSSÃO

A transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium* possui algumas vantagens se comparada a outras técnicas disponíveis atualmente, pois é considerada de menor custo, sendo a opção mais viável para a expressão estável de um gene de interesse, permitindo melhor fixação do gene nas gerações seguintes (TRAVELLA et al., 2005); GIRROTO et al., 2012), e evitando problemas que podem ocorrer na expressão de genes quando introduzidas em múltiplas cópias. Desta forma, esta técnica vem sendo amplamente utilizada nas transformações de um grande número de culturas, incluindo monocotiledôneas e eudicotiledôneas (GELVIN, 2003).

No presente estudo, foram transformados com sucesso, via *Agrobacterium tumefaciens*, cotilédones da cultivar convencional de soja BRS 184, com uma eficiência de 1,1%, apresentando 85% mais eficiência que o trabalho desenvolvido por Giroto et al. (2012), que obteve uma eficiência de 0,17 % porém utilizando outra cultivar de soja (BR 16) e outra construção gênica (*35S:AtAREB1*). O protocolo utilizado neste trabalho difere em alguns aspectos do de Giroto et al. (2012) sendo que este aumento na eficiência de transformação está relacionado a fatores como, genótipo da planta, tipo de tecido transformado, vigor dos explantes, estirpe da bactéria, vetor utilizado, sistema de seleção e condições de cultivo (CHENG et al., 2004). Ainda tem sido relatado que fatores genéticos determinam a susceptibilidade de genótipos da soja para a infecção por *Agrobacterium* e a capacidade de regeneração das plantas no processo de transformação (LIU; WEI, 2005; YING et al., 2008). A variação entre o número de explantes transformados e o número de explantes testados pode ser explicada pela dificuldade em se regenerar plantas de soja em cultura de tecidos, juntamente com o processo de seleção, que ocorre na presença do agente seletivo no meio de cultura, ainda que em baixa concentração (YING et al., 2008).

Quanto a segregação do transgene nos eventos GMs, de acordo com Yin et al. (2004), padrões de segregação excepcionais podem advir de fatores numéricos, como a inserção de mais de uma cópia do gene de interesse no genoma da planta. Decorrente desta inserção anormal, a inativação da expressão do gene de interesse é frequentemente observada

quando estes encontram-se presentes em múltiplas cópias dentro do genoma da planta, podendo ser os responsáveis pela segregação anormal, fora do padrão mendeliano. No presente estudo, no evento GM 2Ha 13-51 não foram identificadas cópias do transgene na geração T_1 , assim como em todas as plantas da geração T_2 . Também para o evento 2Ha 13-52, que apresentou uma cópia do transgene na geração T_1 mas não foi identificada segregação mendeliana na geração T_2 . Estes dados obtidos a partir do evento T_0 2Ha 13 sugerem certa instabilidade da construção gênica inserida neste evento, que pode estar relacionada com o local de inserção no genoma. Para o evento GM 2Ha 11 os padrões de segregação seguiram a proporção de 3:1 de acordo com o teste qui-quadrado (X^2) (Tabela 5), na geração T_2 . Este evento transgênico apresentou baixo número de cópias, de 1 a 4 inseridas no genoma.

Assim a segregação de transgenes está geralmente relacionada ao local de inserção e ao número de cópias inseridas. Quando múltiplas cópias são inseridas, eles podem co-segregar como um locus transgênico, integrando-se em um loci muito próximo ou no mesmo locus (PALOWISKI; SOMERS, 1996). Pelo fato do locus transgênico ser hemizigoto na planta transformada e a maioria dos genes de interesse promoverem um ganho de função nas plantas, estes genes inseridos se comportam como genes dominantes, e tendem a segregar 3:1 conforme o padrão mendeliano. Para o evento 2Ha 11 a interação das cópias pode ter ocorrido no mesmo locus gênico, exibindo o comportamento de um único gene dominante, mesmo com 4 cópias do transgene no genoma (ZHAO et al., 2007). Portanto, deve-se conhecer a zigosidade do evento ou pelo menos ter uma estimativa da zigosidade para se inferir corretamente quantas cópias o evento GM realmente possui.

Considerando a condição de deficiência hídrica a qual o evento 2Ha 11 e as cultivares convencionais de soja BRS 184 e BR 16 foram submetidos, no presente estudo, pode-se afirmar que, com base nos valores de umidade gravimétrica do substrato sob DH, todas as plantas testadas estavam sob déficit hídrico moderado após 7 dias de suspensão da irrigação, com base na classificação descrita por Salinet (2009), onde 15% UG corresponde à condição controle, 5% UG corresponde ao déficit hídrico moderado e 2,5% corresponde ao déficit hídrico severo para o substrato utilizado, e também

considerando os valores de condutância estomática abaixo de $0,2 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (FLEXAS et al., 2004) (Figura13).

Como resultado do déficit hídrico no solo, quando a oferta de água não supre a demanda, modificações no movimento estomático ocorrem como primeira resposta ao déficit hídrico. No presente estudo, não houve diferença nas trocas gasosas (G_s , C_i , A , E) entre o evento 2Ha 11 e as cultivares convencionais na condição controle (C). Porém, sob déficit hídrico (DH), o evento transgênico apresentou redução nas trocas gasosas (Figuras 12 A-B). Similarmente, conforme observado por Pedrosa (2013), plantas de tabaco contendo a construção 35S:CsNCED3 (de *Citros sinensis*) apresentaram mecanismo de evitamento na perda de água, como redução na condutância estomática em relação às plantas *nocautae* (NT). Em outro estudo onde a construção 35S:PvNCED3 (de *Phaseolus vulgaris*) foi inserida em tabaco, observou-se que sob DH as folhas apresentaram menor perda de água por transpiração, resultado da ativação da via biossintética de ABA promovendo o fechamento estomático, confirmado por medidas de condutância estomática, (QIN; ZEEVAART, 2002) corroborando os dados do presente estudo em soja. Luchi et al. (2001) também observaram em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção 35S:AtNCED3 que após dezoito dias de déficit hídrico, houve redução na taxa de transpiração das folhas e maior tolerância à seca em relação às plantas não-transformadas, bem como superexpressaram genes ABA dependentes como *rab18*, *kin1* e *rd29B* (KURTELA; FRANCK, 1990; LANG; PALVA, 1992; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1993; STOLF et al., 2007).

A redução nas trocas gasosas no evento 2Ha 11 sob DH, acarretou uma melhor eficiência intrínseca do uso de água de 223% quando comparado a condição controle, e de 161% maior quando comparada a sua isolinha BRS 184, sob DH (Figura 12 C). Outro dado interessante é que o substrato do evento 2Ha 11 apresentou uma UG 27% menor comparado às cultivares convencionais na condição controle. Por sua vez, sob DH, não houve diferença entre o evento e as cultivares. Os dados sugerem que, além do evento 2Ha 11 apresentar maior eficiência do uso da água sob DH, apresentou maior uso eficiente da água ao consumir 27% menos água sob DH (BLUM, 2009). Cabe ressaltar que a busca do aumento da eficiência no uso da água

em culturas economicamente importantes, como a soja, tem sido motivo de preocupação das pesquisas científicas bem como de produtores rurais, uma vez que este componente da produção cada vez mais ocupa parcela significativa nos custos de produção, bem como na capacidade de sobrevivência das plantas em condições cada vez mais privativas de água (ROZA, 2010). Assim, o evento 2Ha 11 apresentou maior eficiência intrínseca do uso da água sob DH, característica fundamental de tolerância à seca, evidenciando que diante da menor disponibilidade de água o evento transgênico é capaz de utilizar a água intrínseca de forma sustentável, com menores perdas por transpiração em função da diminuição das trocas gasosas e direcionando-a à produtividade como evidenciado em dados de rendimento (Figura 15). Mas é principalmente através de uso eficiente da água em condições favoráveis onde evidencia-se a real capacidade de um genótipo em apresentar maior produtividade, pois a eficiência intrínseca do uso da água sob DH é uma característica temporária (BLUM, 2009).

Quanto aos parâmetros de rendimento, o evento GM 2Ha 11 apresentou MSF 42% maior que sua isolinha BRS 184. A MSF foi o que mais refletiu nos valores de MST que foi 45% maior no evento quando comparado a sua isolinha. Não houve interação genótipo e condição hídrica para estes parâmetros. O fato das massas secas não terem sido alteradas pela condição hídrica sugerem que, o promotor 35S está exercendo sua função ativando o transgene em ambas as condições hídricas constitutivamente.

Os dados de MSF confirmam ainda os dados de AF obtidos para o evento 2Ha 11, que foi em média 39% maior independente da condição hídrica (Tabela 6). Esta característica, juntamente com os dados de trocas gasosas indicam que a defesa das plantas transgênicas ao DH foi diminuir a área de perda de água por transpiração por apresentar uma AF muito maior que sua isolinha. A área foliar é considerada um importante fator de produção pelo fato da fotossíntese ser proporcional à ela, a planta terá uma maior captação de luz e maior produção de fotoassimilados quanto maior for sua AF (FERNANDÉZ; McINNES; CITHREN, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2013). Em contrapartida, quanto maior a AF maior será a superfície de perda de água, porém com o aumento da eficiência intrínseca do uso de água, o evento 2Ha

11 apresentou maior rendimento em grãos, valores que giraram em torno de 40%.

A expansão foliar é bem mais sensível ao déficit hídrico do que a taxa fotossintética. Assim, na maioria dos casos, observa-se uma redução na capacidade produtiva da planta mais pela redução da área foliar do que na taxa de fotossíntese (LACERDA, 2007). No presente estudo, mesmo com uma grande AF, que pode levar a maiores perdas por transpiração e com redução das trocas gasosas, o evento GM 2Ha 11 apresentou melhor eficiência intrínseca do uso da água comparado as cultivares e não teve o rendimento afetado, ao contrário, mostrou-se significativamente maior, principalmente sob DH (Figura 12). Similarmente, Smeeton (2010) observou que linhagens transgênicas de tomate superexpressando o gene *LeNCED1* apresentaram redução na condutância estomática, porém não obtiveram nenhum efeito sobre a biomassa em relação ao controle não transformado, mostrando que de alguma forma a planta *não* é prejudicada em sua produtividade na presença exógeno do gene *NCED*, o que pode estar relacionado ao aumento das concentrações do ABA.

Os parâmetros de crescimento mostraram que o evento 2Ha 11 apresentou em média plantas 13% menores que sua *isolinha*, porém 18% maiores que a cultivar BR 16, independente da condição hídrica (Tabela 6). Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Chen et al. (2011), que demonstraram que as linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com as construções 35S:*LsNCED3* e 35S:*LoNCED3* (*Lilium formosanum* e *L. oriental*, respectivamente) apresentaram plantas com tamanhos menores, fator geralmente relacionado ao promotor constitutivo 35S. No presente estudo, apesar da menor estatura e menor CMI comparado a sua *isolinha*, o evento GM 2Ha 11 apresentou maior NNOS e maior número de vagens com sementes. Além disso, apresentou mesma TCRalt e maior TCRg/dia que sua *isolinha*, o que corrobora os dados de MST.

Apesar de não ter havido diferença significativa em relação ao NSV, MSTs, P1000 e NVSS entre o evento transgênico e sua *isolinha*, os dados mostraram que o evento 2Ha 11 apresentou maior NVCS e NTS em ambas as condições hídricas comparado às cultivares convencionais, com valores em média 40% maiores para as duas variáveis comparado ao sua

isolinha. Na cultura da soja, na fase vegetativa, a falta de água pode reduzir o crescimento e a área foliar, enquanto na reprodutiva provoca menor acúmulo de massa seca, vagens vazias e chochamento de grãos (SAITOH; MAHMOOD; KURODA, 1999). Segundo Desclauxs, Huynh e Roumet (2000), o déficit hídrico parece comandar uma troca precoce do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, bem como resultar em menor número de nós, antecipação da formação de flores e vagens, além de encurtamento da fase reprodutiva, acarretando diminuição no período de enchimento de grãos. Para o evento GM, a restrição da condição hídrica parece não ter resultado, no entanto, em menores valores de parâmetros de rendimento, fato provavelmente associado a maior expressão do gene *AtNCED3*, levando a uma maior expressão do gene endógeno *GmAAO3* (Figura 16), precursor imediato do ABA na via biosintética. Este aumento da expressão gênica pode ter levado a maiores concentrações de ABA na planta, resultando na ativação de mecanismos que auxiliaram o evento transgênico na manutenção do metabolismo e no direcionamento da energia para a produção, mesmo em condições de déficit hídrico.

Os dados de quantificação gênica relativa mostraram que os níveis do transgene *AtNCED3* e do gene endógeno *GmAAO3* foram maiores sob déficit hídrico quando comparados a condição controle, e também as cultivares convencionais. Segundo Melhorn et al (2008) em fava (*Vicia faba*), uma maior expressão das duas enzimas (*AtNCED3* e *AAO3*), levou a uma diminuição da condutância estomática demonstrando que ambas enzimas estão envolvidas na biossíntese do ABA em resposta ao déficit hídrico. Também em *A. thaliana*, a expressão do gene *OsNCED3* (*Oryza sativa*) aumentou a tolerância à seca pela redução na abertura estomática (HWANG et al., 2010), corroborando as evidências da sua importância na via biossintética do ABA. Em feijão (*Phaseolus vulgaris*) sob de déficit hídrico, o gene *PvNCED* foi altamente induzido em níveis de RNAm e proteínas, e folhas destacadas de tabaco GM com o gene *PvNCED* apresentaram menor perda de água por transpiração, resultado da ativação da via biossintética de ABA promovendo fechamento estomático, fato confirmado por medidas de condutância estomática (QIN; ZEEVART, 2002). Resultados semelhantes foram observados para o gene *LeNCED* em tomates sob condições de déficit hídrico (BURBIDGE et al., 1999). Igualmente para feijão de corda (*Vigna unguiculata*) foi

identificado um aumento da expressão do gene *VuNCED1* em caules e folhas de plantas com oito dias submetidas a 10h de desidratação (IUCHI et al., 2000). Em abacate (*Persea americana*), a expressão do gene *PaNCED1* foi significativamente maior em resposta à perda de água em folhas desidratadas a 80% (CHERNYS; ZEEVAART, 2000). Da mesma forma, em amendoim (*Arachis hypogaea*), a expressão de *AhNCED1* foi maior em resposta à seca (WAN; LI., 2005). Assim, como em outras culturas importantes, baseado nos dados obtidos, a maior expressão de *AtNCED3* em soja pode ter resultado em maior tolerância ao déficit hídrico nas plantas transgênicas.

Os genes *GmPP2C*, *GmSnRK2* e *GmAREB1* também apresentaram maiores valores de expressão sob déficit hídrico quando comparado a condição controle (3,9 X; 1,4 X e 3,7 X respectivamente). Sabe-se que o ABA se liga a receptores PYR/PYL/RCAR e são regulados negativamente por PP2Cs e positivamente por SnRK2, esta última ao ser ativada na presença de ABA fosforilam fatores de transcrição AREB/ABF ou proteínas de membrana que envolvem canais iônicos (UMEZAWA et al., 2004; SAEZ et al., 2004; FUJII et al., 2007; KOMATSU et al., 2009; SANTIAGO et al., 2009b; UMEZAWA et al., 2010). Porém para que haja uma eficiência na regulação da atividade do ABA é necessário manter o equilíbrio entre síntese e atividade do fitormônio. Assim, o aumento nos níveis da PP2C é fundamental para que esse equilíbrio ocorra. No presente estudo os níveis do gene *GmPP2C* subiram 3,9 x sob DH quando comparado a condição controle e as cultivares convencionais, indicando que o aumento nos níveis do transgene e possivelmente acúmulo de ABA, resultou aumento da expressão da PP2C, para manutenção do equilíbrio síntese/consumo do fitormônio.

Pesquisadores ao medir a atividade PP2C em extratos de tipo selvagem e plântulas nocaute de *Arabidopsis thaliana*, obtiveram evidências de que o ABA aumenta a atividade da PP2C, agindo por *feedback* negativo da via de sinalização ABA. Este ciclo pode ser responsável por repor o ABA na cascata de sinalização, permitindo desse modo que a célula monitore continuamente a presença ou ausência de ABA (MERLOT et al., 2001). Outra forma regulatória, se dá pela ação do ABA em *cis* elementos ABRE, presentes também na região promotora do gene *NCED3*. Neste caso, o ABA atua na expressão de *AtNCED3* por *feedback* positivo.

A quinase *GmSnRK2* também teve seu nível de expressão aumentado em torno de 1,4X sob DH quando comparado ao controle e as cultivares convencionais. A ativação de quinases, responsáveis por fosforilar os fatores de transcrição ABF (bZIPs) ocorre devido ao acúmulo de ABA, resultado da percepção da perda de água pelas plantas. Desta forma, ocorre a regulação da expressão de genes ABA dependentes e conseqüentemente da ativação de mecanismo de defesa contra a seca como o fechamento estomático (BHASKARA et al., 2012). No entanto, no citoplasma da célula, as quinases podem, ainda, fosforilar canais aniônicos lentos (SLAC1) ou os canais de potássio (*kat1*) para induzir fechamento estomático em resposta ao ABA (UMEZAWA et al., 2010).

Também o fator de transcrição AREB1/ABF2 é fosforilado pelas SnRK2s (FURIHATA et al., 2006). Neste estudo a expressão de *GmAREB1* no evento 2Ha 11 foi 3,7X sob DH quando comparado ao controle e as cultivares convencionais, corroborando a expressão ABA dependente do gene endógeno *GmAREB1*, induzida pelo transgene inserido *AtNCED3*. Estudos recentes têm demonstrado a importância e o potencial de proteínas AREB1 e bZIP no aumento da tolerância ao déficit hídrico (FUJITA et al., 2011; GAO et al., 2011; KIM et al., 2011). Além disso, a superexpressão constitutiva de AREB1/ABF2, ABF3 ou ABF4 em *Arabidopsis* resultou no aumento de tolerância à seca (FUJITA et al. 2005; KANG et al. 2002). Por sua vez, a superexpressão do tipo ABF2 em *Arabidopsis* promoveu a tolerância à seca (Kim et al. 2004). Em soja, Barbosa et al. (2012) obtiveram plantas mais tolerantes que sobreviveram a seis dias de déficit hídrico e que três dias após re-irrigação não apresentaram nenhum dano foliar. Além disso, a fotossíntese destas linhagens foi significativamente maior que da cultivar BR 16 (isolinha), em um grau de déficit hídrico considerado severo (condutância estomática no quinto dia após tratamento de, aproximadamente, $0.1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, segundo FLEXAS et al., 2004). Utilizando outra construção gênica também com o gene AREB, Leite et al. (2014) identificaram plantas transformadas com maior taxa de sobrevivência (100%), melhor eficiência do uso da água e maior número de folhas que sua isolinha, a cultivar BR 16, sugerindo que também em soja, o fator de transcrição AREB1 está relacionado com respostas a seca.

Assim, os dados moleculares e fisiológicos obtidos no presente estudo, sugerem que expressão diferencial dos genes analisados podem ter promovido um controle da síntese de ABA e de sua atuação nas células através de mecanismos de *feedback* positivo e negativo. Inicialmente o aumento da expressão do gene *AtNCED3*, gerou compostos que clivados pela enzima subsequente, a AAO3, resultaram na síntese e aumento dos níveis de ABA na planta. Esse acúmulo de ABA pode ter induzido o aumento da expressão de componentes do aparato perceptivo do fitormônio, com as proteínas *GmPP2C* e *GmSnRK2*, que além de controlarem os níveis corretos do fitormônio para uma atividade eficiente, atuarem sobre canais iônicos que auxiliam o fechamento estomático sob DH, promoveram ainda a ativação do gene *downstream GmAREB1*, importante fator de transcrição de topo de cascata gênica que culmina com a expressão de várias respostas de defesa vegetal a períodos de déficit hídrico.

5.5 CONCLUSÕES

- A construção gênica *35S:AtNCED3* foi inserida com sucesso no genoma da soja, via *Agrobacterium tumefaciens* e 2 eventos positivos foram obtidos (2Ha 11 e 2Ha 13);
- O evento GM 2Ha 11 apresentou segregação conforme os padrões mendelianos e foram identificadas de 1 a 4 cópias do transgene; o evento GM 2Ha 13 apresentou 1 cópia e segregação não mendeliana;
- O transgene *AtNCED3* e os genes endógenos *GmAAO3*, *GmPP2C*, *GmSnRK2* e *GmAREB1* foram mais expressos no evento GM 2Ha 11;
- O evento 2Ha 11 conservou maior volume de água no substrato na condição de DH apresentando maior eficiência no uso da água, sugerindo um mecanismo de tolerância a seca em função da maior expressão dos genes *AtNCED3*.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. de F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the ABA-dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. *Plant Molecular Biology Research*. **Plant Mol Biol Rep**, 2012.

BHASKARA, G. B.; NGUYEN, T. T.; VERSLUES, P. E. Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. **Plant Physiology**, v. 160, p. 379-395, 2012.

BLUM, A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field Crops Research**, v. 112, n. 2, p. 119-123, 2009.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **The Plant Journal**. v. 17, p. 427–431, 1999.

CHAN, Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. **Genomics**, v. 100, n. 2, p. 110-115, 2012.

CHEN, H. C.; HWANG, S. G.; CHEN, S. M.; SHII, C. T.; CHENG, W. H. ABA-mediated heterophylly is regulated by differential expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 in lilies. **Plant Cell Physiology**, v. 52, p. 1806-21, 2011.

CHENG, M.; LOWE, B. A.; SPENCER, T. M.; YE, X.; ARMSTRONG, C. L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 31-45, 2004.

CHERNY, J. T.; ZEEVAART, J. A. D. Characterization of the 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado. **Plant Physiology**, v. 124, p. 343–353, 2000.

CUTLER, S. R.; RODRIGUES, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ADAMS, R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review Plant Biology**, v. 61, p. 651-679, 2010.

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

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

ENGELS, C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARIN, S. R. R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; KANAMORI, N.; NEPOMUCENO, A. L. Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 556–565, 2013.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Sci.**, v.11, n.6, p.929-931, 1971.

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

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.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v.6, p.269–279, 2004.

FUJII, H.; VERSLUES, P. E.; ZHU, J. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 19, p. 485 – 494, 2007.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATO, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K. AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent

ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17.p. 3470–3488, 2005.

FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509-525, 2011.

FURIHATA, T.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 1988–1993, 2006.

GAO, F. H.; ZHANG, H. L.; WANG, H. G.; GAO, H.; LI, Z. C. Comparative transcriptional profiling under drought stress between upland and lowland rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-AFLP. **Chinese Science Bulletin**, v.54, p.3555-3571, 2009.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 67, p. 16-37, 2003.

GIROTTI, L.; SOLDERA, M. C. A.; HONNA, P. T.; KANAMORI, N.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cultivar, BR 16, gene 35S:AREB1. In: **VI Congresso Brasileiro de Soja**. Cuiabá, MT, 2012.

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.

GHASSEMIAN, M.; LUTES, J.; CHANG, H. S.; LANGEM I.; CHEN, W.; ZHU, T.; WANG, X.; LANGEM B. M.; Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2899-2911, 2008.

HWANG, S. G., CHEN, H. C., HUANG, W. Y., CHU, Y. C., SHII, C. T., & CHENG, W. H. Ectopic expression of rice OsNCED3 in Arabidopsis increases ABA level and alters leaf morphology. **Plant science**, v. 178, n. 1, p. 12-22, 2010.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerance cowpea. **Plant Physiology**, v. 123, p. 553-562, 2000.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 27, p. 325–333, 2001.

KANG, J. Y.; CHOI, H. I.; IM, M. Y.; KIM, S. Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, v. 14, p. 343–357, 2002.

KIM, S.; CHOI, H.; RYU, H. J.; PARK, J. H.; KIM, M. D.; KIM, S. Y. ARIA, an Arabidopsis Arm Repeat Protein Interacting with a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, Is a Novel Abscisic Acid Signaling Component. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3639–3648, 2004.

KIM, T-H.;BOHMER, M.; HU, H.;NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J. I. Guard cell signal transduction network: Advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 561-591, 2010.

KIM, S. H.; WOO, D. H.; KIM, J. M.; LEE, S. H.; CHUNG, W. S.; MOON, Y. H. *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, p. 150-154, 2011.

KOMATSU, K.; NISHIKAWA, Y.; OHTSUKA, T.; TAJI, T.; QUATRANO, R.; TANAKA, S.; SAKATA, Y. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and *themooss Physcomitrella patens*. **Plant Molecular Biology**, v. 70, p. 327–340, 2009.

KURKELA, S.; FRANCK, M. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible Arabidopsis gene. **Plant Molecular Biology**, v. 15, p. 137-144, 1990.

LACERDA, C. F. PARTE, I. "Relações Solo-Água-Planta Em Ambientes Naturais E Agrícolas Do Nordeste Brasileiro." Apostila, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

LANG, V.; PALVA, E. T. The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 951-962, 1992.

LEITE, J. P.; BARBOSA, E. G. G.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F.; FUGANTI-PAGLIANI, R.; CRUZ, A.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, L. R. B.; NEUMAIER, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; YOSHIDA, T.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; DESODERIO, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1 Δ QT) improves soybean responses to water deficit. **Genetics and Molecular**, v. 13, p. 6272-6286, 2014.

LIU, H. C.; WEI, Z. M. Recent advances in soybean genetic transformation. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 31, p. 126–134, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science**, v. 324, p. 1064–1068, 2009.

MARTÍNEZ-ANDUJAR, C.; ORDIZ, M. I.; HUANG, Z.; NONOGAKI, M.; BEACHY, R. N.; NONOGAKI, H. Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 108, p. 17225–17229, 2011.

MELHORN, V.; MATSUMI, K.; KOIWAI, H.; IKEGAMI, K.; OKAMOTO, M.; NAMBARA, E.; BITTNER, F.; KOSHIBA, T. Transient expression of AtNCED3 and AAO3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. **Journal of Plant Research**, v. 121, p. 125–131, 2008.

MERLOT, S.; GOSTI, F.; GUERRIER, D.; VAVASSEUR, A.; GIRAUDAT, J. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. **Plant Journal**, v. 25, p. 295–303, 2001.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular Biotechnology**, v. 6, p. 17–30, 1996.

PAZ, M. M.; MARTINEZ, J. C.; KALVIG, A. B.; FONGER, T. M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 206-213, 2006.

PEDROSA, A. M. Análise funcional dos genes CsLEA2 e CsNCED3 para tolerância a seca em citros. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2013.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 15354–15361, 1999.

QIN, X.; ZEEVAART, A. D. Overexpression of a 9-cis-Epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. **Plant Physiology**, v. 128, p. 544-551, 2002.

REEVES, W. M.; LYNCH, T. J.; MOBIN, R.; FINKELSTEIN, R. R. Direct targets of the transcription factors ABA-insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. **Plant of Molecular Biology**, v. 75, p. 347–363, 2011.

RODRIGO, M. J.; ALQUEZAR, B.; ZACARÍAS, L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 633–643, 2006.

ROZA, F. A. Alterações morfofisiológicas e eficiência de uso da água em plantas de *Jatropha curcas* L. submetidas à deficiência hídrica. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SAEZ, A.; APOSTOLOVA, N.; GONZALEZ-GUZMAN, M.; GONZALEZ-GARCIA, M. P.; NICOLAS, C.; LORENZO, O.; RODRIGUEZ, P. L. Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1

reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. **The Plant Journal**, v. 37, p. 354–369, 2004.

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

SALINET, L. H. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; SAEZ, A.; RUBIO, S.; ANTONI, R.; DUPEUX F.; PARK, S. Y.; MÁRQUEZ, J. A.; CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. **The Plant Journal**, v. 60, p. 575-578, 2009b.

SATO, A.; SATO, Y.; FUKAO, Y.; FUJIWARA, M.; UMEZAWA, T.; SHINOZAKI, K.; HIBI, T.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H.; GOTO, D. B.; UOZUMI, N. Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. **Biochemical Journal**, v. 424, p. 439–448, 2009.

SCHWEIGHOFER, A.; HIRT, H.; MESKIENE, I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 236–243, 2004.

SMEETON, R.C. THESIS (PhD). An evaluation of the effects of over-production of ABA on whole plant water use, growth and productivity. University of Warwick. January, 2010.

STOLF, R. "Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real.", 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 918, 2013.

TRAVELLA, S.; ROSS, S. M.; HARDEN, J.; EVERETT, C.; SNAPE, J. W.; HARWOOD, W. A. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. **Plant Cell Reports**, v. 23, p.780–789, 2005.

UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; MARUYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. SRK2C. A SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 17306-17311, 2004.

UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; ISHIHAMA, Y.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 106, p. 17588–17593, 2009.

UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant Cell Physiology**, v. 11, p. 1821 – 1839, 2010.

WAN, X. R.; LI, L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea*. **DNA sequence**, v. 16, p. 217-233, 2005.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 8588–8596, 2002.

YAMADA, T.; WATANABE, S.; ARAI, M.; HARADA, K.; KITAMURA, K. Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. **Plant biotechnology**, v. 27, p. 217-220, 2010.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. **Plant Physiol**, v. 101, p. 1119-1120, 1993.

YIN, Z.; PLADER, W.E.; MALEPSZY, S. Transgene inheritance in plants. **Journal of Applied Genetics**, v.45, p.127-144, 2004.

YING, S.; HE, X. W.; WANG, X. R.; SHOU, H. X. Assessment of factors affecting the transformation efficiency of soybean cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated transformation system. **Molecular Plant Breeding**, v. 6, p. 32–40, 2008.

ZHAO, Y.; QIAN, Q.; WANG, H.; HUANG, D. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, n.9, p.824-35, 2007.