



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELTON GARGIONI GRISOSTE BARBOSA

**OBTENÇÃO, SELEÇÃO DE EVENTOS DE SOJA
CONTENDO O GENE *AtAREB1* E ANÁLISES DA
SINALIZAÇÃO ABA-DEPENDENTE**

ELTON GARGIONI GRISOSTE BARBOSA

**OBTENÇÃO, SELEÇÃO DE EVENTOS DE SOJA
CONTENDO O GENE *AtAREB1* E ANÁLISES DA
SINALIZAÇÃO ABA-DEPENDENTE**

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
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B238o Barbosa, Elton Gargioni Grisoste.
Obtenção, seleção de eventos de soja contendo o gene AtAREB1 e análises da sinalização ABA-Dependente / Elton Gargioni Grisoste Barbosa. – Londrina, 2012.
vi, 101 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, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Déficit hídrico – Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. Plantas transgênicas – Teses. 5. Biotecnologia vegetal – 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. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:633.34

ELTON GARGIONI GRISOSTE BARBOSA

**OBTENÇÃO, SELEÇÃO DE EVENTOS DE SOJA CONTENDO O
GENE *AtAREB1* E ANÁLISES DA SINALIZAÇÃO ABA-DEPENDENTE**

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

Dra. Renata Fuganti-Pagliarini
EMBRAPA - Soja – Londrina – PR

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
EMBRAPA - Agroenergia – Londrina – PR

Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães
EMBRAPA - Soja / UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2012.

Dedico e Ofereço

Ao Grande Arquiteto do Universo

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus exemplos de vida, Ilton e Ioná, pai e mãe, guerreiros que me ensinaram no dia-a-dia como se molda um ser humano pelo coração, dignidade, caráter, amor e também pelos erros, afinal, acima de tudo humanos, demasiado humanos, característica fundamental pra quem sabe a essência de viver, e isso me ensinaram com maestria. Tamo longe mas tamo junto;

À minha linda e amada esposa, pela paciência, parceria, amizade, amor, dedicação, carinho, cumplicidade, ouvidos treinados a ouvir heavy metal no talo (rs) e todo o significado de “estar ao seu lado” que continuas a me ensinar; sua presença em minha vida é imprescindível, te amo;

Ao meu irmão Everton e cunhada Camila, enfim casados e felizes; à minha vó Inah, quem mais me ensinou a ter *spiritus liber*, pela compaixão, humildade e pelo Prana, o sopro da Vida; à minha sogra Ruth, pela força, sabedoria, tortas de requeijão e inúmeras receitas alemãs pra “bom-de-garfo”; às Famílias Grisoste Barbosa e Gargioni, sempre em meus pensamentos;

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 com esta construção gênica e contribuir nesse amplo ramo da genética vegetal;

Ao Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, por ter me concedido a oportunidade de ser seu orientado, e por quem tenho uma admiração notória pela sua determinação e macro-visão de ciência;

Ao Dr. Eliseu Binneck, pela oportunidade inicial de trabalhar na Embrapa-Soja e pelo grande aprendizado durante os trabalhos na Bioinformática; ao Dr. Ricardo Abdelnoor e Dra. Francismar Marcelino-Guimarães pelas diversas formas de contribuições e conselhos; ao Dr. Hugo Molinari pela participação na banca examinadora; à Dra. Josirley pelas correções;

À minha co-orientadora Dra. Renata Fuganti-Pagliarini pelas incontáveis “burocras” e correções, pela amizade, bom-humor e sabedoria com que trata todos os seus deveres, sabendo o equilíbrio do que é ser pessoal e profissional ao mesmo tempo;

Às minhas parceiras principais de “mão-na-massa” Silvana Rockenbach Regina Marin, uma incrível mulher com tato para a ciência, pelos seus incontáveis conselhos científicos; e à Juliana Paula Leite, uma grande amiga no mestrado, e provedora das famosas trufas para o laboratório. Sem vocês esse trabalho desandaria! Muito obrigado;

À Dra. Mayra Carvalho e Dr. Norihito Kanamori pelas considerações gerais no trabalho; Amanda Paiva Rolla e Cibelle Engels pela amizade, conselhos durante esse tempo e pelos seus exemplos e dedicação à pesquisa; Juliane Marinho pela parceria e ajuda durante uma boa etapa do trabalho; César, Larissa e Gislaine pela essencial etapa inicial de transformação, aprendi muito com vocês; aos ex-parceiros e amigos Lucas Soares, Marcelo Iwata, Josué Vitorino e Paulo Silla pelos bons momentos e grandes aprendizados no extraordinário mundo da computação; Valéria Lopes pela amizade e ajuda na análise dos resultados de expressão relativa;

Aos casais amigos e buena onda Salvador e Livia, e Alan e Águida pelas inúmeras reuniões para arejar a cabeça, tomar umas (muitas), churrasquear e jogar vídeo-game, valeu;

Aos demais loucos de buena presentes no lab Marcinha, Renan, Dani, Vieira, Verinha, Cynara, André, Ciça, Rodrigo, Patrícia, Jhennifer, João, Dri, Maysa, Mayra, Lizandra, Michele, Luana, Paula, Idenize, Paulo, Edgar, Ju cachinhos, Kleber, Thiago, Mayla, Bia, Zi, Stolf, Leidy, Jairo, Fabi, Nô, Carol, Selma (in memoriam), Hitomi (in memoriam), Taty ... um grupo heterogêneo onde cada um de sua forma me ensinou algo, obrigado;

À Dra. Ana Lúcia Dias, Maria Sueli e demais estrutura administrativa do PPG em Genética e Biologia Molecular da UEL, pela boa vontade e responsabilidade com que sempre atenderam meus pedidos;

À todos os professores que conheci nessa jornada, obrigado pelos ensinamentos;

À toda forma de arte e pensamento crítico-construtivo, anti-senso-comum e anti-doutrinador que ajuda no processo de aprendizagem, evolução e tolerância ao observar tanto mal existente nesse mundo; de toda forma, deve-se olhar com perspectivas boas e confiantes para trucidar o negativo e exaltar o existir! *Hail Passengers and Voyagers!*

“Só uma visão sistêmica, unitária e sinfônica poderá nos aproximar de uma compreensão do que é nosso

maravilhoso planeta vivo”

José Lutzenberger

BARBOSA, Elton Gargioni Grisoste. **Obtenção, Seleção de Eventos de Soja Contendo o Gene *AtAREB1* e Análises da Sinalização ABA-Dependente**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2012.

RESUMO

Nos últimos anos, o Brasil tem estado à frente de inúmeros progressos científicos, gerando crescimento não somente no setor tecnológico, mas por extensão, também no setor econômico. Com a produção de soja como carro-chefe no agronegócio brasileiro, é imprescindível que estratégias de engenharia genética voltadas para tolerância à estresses abióticos como a seca estejam entre os principais investimentos dentro da ciência e tecnologia nacional. Atualmente, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) tem focado suas estratégias na introdução de fatores de transcrição (FT) que controlam inúmeros genes estresse-induzidos. O gene *AREB1* é um FT com domínio bZIP e está relacionado à cascata ABA-dependente sob déficit hídrico. O objetivo do presente estudo foi obter plantas de soja geneticamente modificadas com a construção *pBI35S Ω :AtAREB1* (*35S:AREB1*) e caracterizar os eventos obtidos via *Southern blot* e RT-qPCR quanto ao número de cópias e expressão relativa do transgene em condições controle, além da segregação para a geração T₁. Com base nos resultados obtidos, três eventos candidatos foram escolhidos para estudos posteriores relacionados à tolerância ao estresse hídrico em experimentos a serem conduzidos em casa de vegetação. Este é o primeiro estudo reportando a modificação genética de soja com esta construção. A eficiência de transformação obtida foi de 0,75% (12 eventos positivos/1583 embriões transformados). De um total de oito eventos confirmados como positivos e não quiméricos, foram selecionados os candidatos A24, A2889 e A2057, com uma ou duas, três e inúmeras cópias, respectivamente, e diferentes expressões relativas do transgene entre si. Adicionalmente, uma derivação da fórmula empregada normalmente para metodologias de quantificação de número de cópias por RT-qPCR também foi utilizada, onde é descartado o uso de um evento previamente caracterizado com o gene de interesse como calibrador, utilizando-se assim o próprio gene de referência endógena através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os resultados foram coerentes pela comparação com métodos mais tradicionais como o *Southern blot*. Conclui-se que a introdução da construção *35S:AREB1* em soja via biobalística originou eventos estáveis e com poucas cópias do transgene, constituindo-se em um importante passo não somente para o entendimento dessa via de sinalização ABA-dependente, mas também para desenvolver estratégias eficazes e sistêmicas à curto/médio prazo na obtenção de plantas tolerantes ao déficit hídrico.

Palavras-chaves: Estresse hídrico. *AREB1*. ABA-dependente. *Glycine max*

BARBOSA, Elton Gargioni Grisoste. **Obtaining, selection of soybean events containing *AtAREB1* gene and analysis on ABA-dependent signalization.** 2012. 101 p. Master thesis (Master in Genetics and Molecular Biology). Londrina State University, 2012.

ABSTRACT

In the latest years, Brazil has been positioned ahead of many scientific progresses, generating growth not only in the technological sector but also by extension in economic sector. As soybean production is economy flagship, it is indispensable that genetic engineering strategies focused on abiotic stresses tolerance such as drought to be amongst the major investment in science and national technology. Currently, the development of genetically modified plants (GMPs) is focused on the introduction of transcription factors (TFs) that controls numerous stress-inducible genes. The *AREB1* gene is a TF with bZIP domain and is related to the ABA-dependent pathway under water stress. The objective of the present study was to obtain soybean plants genetically modified with the *pBI35S::AtAREB1* (*35S::AREB1*) genetic construction and characterize these events using Southern blot and RT-qPCR regarding to copy number and transgene relative expression under control conditions, besides segregation study on T₁ generation. Based on the results obtained, three candidate events were chosen to be used in further studies on water deficit tolerance in greenhouse conditions. This is the first study reporting the use of this genetic construction in soybean. Transformation efficiency was 0,75% (12 positive events/1.583 transformed embryos). From a total of eight positive and non-chimeric events, three best candidate events were chosen, A24, A2889 and A2057 with one or two, three and above ten copies, respectively, and showing different transgene relative expression. Additionally, a derivation of the formula normally used to quantify number of inserted copies using RT-qPCR was used, in which the use of a previously known calibrator sample is discarded. Instead, an endogenous reference gene was used as the calibrator through the formula $2^{-\Delta Ct}$. Results from Southern blot and RT-qPCR techniques were consistent when compared. Thus, the introduction of *pBI35S::AtAREB1* in soybean via biolistic generated stable events containing few copies of the transgene. These results are important not only on the understanding of the ABA-dependent signalling pathway but also on the development of short-term efficient and systemic strategies to obtain soybean plants tolerant to drought.

Key-words: Water deficit. *AREB1*. ABA-dependent. *Glycine max*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Fig. 1 – Redes de regulação transcricional dos sinais de estresse abiótico e expressão gênica	31
Fig. 2 – Características fisiológicas e anatômicas associadas à tolerância a seca em soja	32
Fig. 3 – Via de sinalização ABA-dependente mínima	35
Fig. 4 – Classificação das proteínas bZIPs de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
Fig. 5 – Estrutura primária dos domínios em fatores bZIP	40
Fig. 6 – Estrutura tridimensional das proteínas bZIPs ligadas aos seus cis elementos no DNA	40
Fig. 7 – Árvore filogenética de GmbZIP1 e outros fatores bZIPs divididos em seus respectivos grupos.....	41
Fig. 8 – Mecanismos gerais da regulação pós-traducional dos principais grupos estudados de fatores de transcrição bZIPs em <i>Arabidopsis</i> (A, C, D, G, H, I e S).....	43
Fig. 9 – Visão geral da sensibilidade, sinalização e transporte do ABA.....	44
Fig. 10 – Árvore filogenética dos componentes principais na sinalização ABA-dependente.....	46

CAPÍTULO 2

Fig. 1 – Mapa de restrição do plasmídeo pBI221 com o inserto (promotor 35S + AREB1 + terminador NosT): pBI35S Ω :AtAREB1 ou 35S:AREB1	63
Fig. 2 – Mapa de restrição do plasmídeo pAC321 contendo a sequência do gene Ahas (promotor Ahas + Ahas 5' UTR + Ahas CDS + Ahas 3' UTR): Ahas	63
Fig. 3 – Esquema do plasmídeo linearizado com as regiões onde os diferentes conjuntos de primers se anelam para amplificação via PCR.....	65

- Fig. 4** – PCR convencional das linhagens de soja identificadas como positivas para a construção gênica 35S:AREB1. As amostras foram amplificadas com diferentes conjuntos de primers. a) O conjunto de primer Areb1-6 se anela do início da região promotora até o início da região codante e amplifica um fragmento de 904 pb. b) O conjunto de primer Areb1-7 se anela do meio do promotor até o final da região codante e amplifica um fragmento de 639 pb. c) O conjunto de primer Areb1-8 se anela entre as regiões do final do promotor até o início da região terminadora e amplifica um fragmento de 1502 pb. Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de AtAREB1; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: ladder 1 Kb Plus73
- Fig. 5** – PCR convencional realizado com as plantas positivas para verificar a possível ocorrência de eventos quiméricos para a construção 35S:AREB1. Diferentes amostras de DNA dos tecidos foliares foram coletadas (a, b, c e d na figura) e amplificadas com o conjunto de primer Areb1-8, que se anela entre as regiões do final do promotor até o início da região terminadora, amplificando um fragmento de 1502 pb. Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de AtAREB1; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: ladder 1 Kb Plus73
- Fig. 6** – PCR convencional realizado com plantas de soja positivas mas identificadas como quiméricas para a construção 35S:AREB1. Diferentes amostras de DNA dos tecidos foliares foram coletadas (a, b, c e d na figura) e amplificadas com o conjunto de primer Areb1-6. Legendas = 9: A3178; 10: A3297; 11: A3301; 12: A2078; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de AtAREB1; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: ladder 1 Kb Plus74

- Fig. 7** – PCR mostrando os oito eventos T_0 caracterizados como positivos para o gene AtAREB1 mas negativos para o plasmídeo contendo o gene Ahas. Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1 e C+2: controles positivos, plasmídeos contendo a construção ahas; C-1 à C-3: controles negativos com as diferentes construções de AtAREB1; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: ladder 1 Kb Plus75
- Fig. 8** – Bancada em casa de vegetação com os seis eventos GMs de soja em geração T1 para multiplicação de sementes.....77
- Fig. 9** – Determinação da eficiência do sistema multiplex TaqMan para os alvos AtAREB1 e endógeno GmLectina. Uma amostra GM foi diluída serialmente 4X e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema multiplex para os alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. a) Estimativa da eficiência do gene AtAREB1 com slope = 3,3655. b) Estimativa da eficiência do gene GmLec de referência endógena com slope = 3,4325.....79
- Fig. 10** – Southern blot das plantas de soja geneticamente modificadas com a construção gênica 35S:AREB1. a) Hibridização de sete eventos da geração T_0 . b) Hibridização dos trinta e quatro eventos da geração T_1 . Controle negativo = BR16.....81
- Fig. 11** – Eficiência dos primers de AtAREB1 e Gm β -actina utilizados para a normalização da reação de quantificação da expressão relativa dos eventos da geração T1 obtidos pela técnica de RT-qPCR.....86
- Fig. 12** – Comparação da expressão gênica relativa do transgene AtAREB1 na geração T1 dos seis eventos obtidos em relação ao calibrador (A2992.01), sem indução de estresse. A expressão do transgene foi normalizada com o gene Gm β -actina e calibrada com o evento A2992.01 pela menor expressão relativa dentre os eventos obtidos. As análises foram realizadas com teste T a nível de significância de 5%87

ANEXOS

- Fig. 13** – Digestão do DNA genômico de sete plantas de soja geneticamente modificadas contendo a construção 35S:AREB1. a) Reação de digestão realizada com a enzima HindIII em sete amostras da geração T_0 . b) Reação de digestão realizada com a enzima HindIII em todos os trinta e quatro eventos da geração T_1 . BR16 = Controle positivo.....98
- Fig. 14** – Curva de dissociação da reação de eficiência dos primers usados na quantificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR para a confirmação dos eventos quiméricos e positivos para a construção AtAREB1	65
Tabela 2	– Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como primers e as sondas dos genes AtAREB1 e GmLec para as análises de RT-qPCR	67
Tabela 3	– Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a marcação da sonda nas análises de Southern blot	69
Tabela 4	– Sequências de primers dos genes AtAREB1 e Gm β -actina utilizados para análise de expressão constitutiva dos transgenes	71
Tabela 5	– Descendência das PGMs de soja sem marcador de seleção obtidas com o gene AtAREB1	76
Tabela 6	– Número de cópias (quantidade de transgenes) obtidas de acordo com o método 2- Δ Ct via RT-qPCR para sete eventos de soja em geração T ₀ e seis eventos em geração T ₁ contendo a construção 35S:AREB1	80
Tabela 7	– Proporção da segregação do gene AtAREB1 em geração T ₁ dos seis eventos GMs obtidos com a construção 35S:AREB1	81
Tabela 8	– Comparação das técnicas de quantificação de número de cópias e insertos em plantas de soja GM contendo o gene AtAREB1, excluindo interpretações sobre a zigosidade dos eventos	85
Tabela 9	– Tabela relacionando a quantidade de sementes produzidas na geração T ₂ proveniente dos seis eventos T ₁ contendo o gene AtAREB1 em soja	88

ANEXOS

Tabela 10	– Soluções usadas nas reações de Southern	98
------------------	---	----

Tabela 11 – Valores dos Ct's das amostras amplificadas para o cálculo de número de cópias para a geração T0	99
Tabela 12 – Valores dos Ct's das amostras amplificadas para o cálculo de número de cópias para a geração T1	100

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	A SOJA, OS ESTRESSES ABIÓTICOS E A ENGENHARIA GENÉTICA	20
2.1.1	Método de Transformação de Plantas Via Biobalística.....	23
2.1.2	Caracterização Molecular de PGM's	25
2.1.2.1	Técnicas para quantificação do transgene inserido	25
2.1.2.2	Método comparativo Δ Ct para quantificação relativa da expressão do gene de interesse	26
2.1.3	Análises Quanto à Inserção e Estabilidade dos Transgenes.....	27
2.1.3.1	Número de cópias e zigosidade.....	27
2.1.3.2	Integração, herança e silenciamento	28
2.2	DA PERCEPÇÃO DA SECA ÀS RESPOSTAS MOLECULARES, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS RESULTANTES DA EXPRESSÃO GÊNICA	30
2.3	O VERSÁTIL HORMÔNIO VEGETAL ÁCIDO ABCÍSIKO.....	33
2.3.1	Avanços Recentes na Pesquisa da Via de Sinalização ABA-Dependente	34
2.3.2	Mecanismos Centrais da Sinalização ABA-Dependente	34
2.4	PROTEÍNAS bZIPs E OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO AREBs/ABFs	36
2.4.1	GmbZIP1, o Ortólogo de AtAREB1 da soja	41
2.4.2	Dimerizações e Modificações Pós-Traducionais das Proteínas bZIPs	42
2.4.3	Complexo de Sinalização do ABA e a Cascata ABA-Dependente de AREB1	43
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO 2

5	ARTIGO	59
5.1	INTRODUÇÃO E ABSTRACT.....	59
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
5.2.1	Obtenção do Cassete de Expressão	61
5.2.2	Co-transformação Via Biobalística com a Construção Gênica 35S:AREB1	62
5.2.3	Identificação dos Eventos Quiméricos e Positivos por PCR Convencional	64
5.2.4	Quantificação Relativa do Número de Cópias do Transgene via RT- qPCR	66
5.2.5	Quantificação Relativa Utilizando a Referência Endógena como Calibrador pelo Método 2- Δ Ct.....	67
5.2.6	Quantificação do Número de Insetos do Transgene Via Southern Blotting	68
5.2.7	Análise da Expressão Constitutiva via RT-qPCR.....	70
5.2.8	Análises de Proporção e Segregação dos Transgenes	71
5.3	RESULTADOS	72
5.3.1	Eventos Quiméricos e Plantas de Soja GMs com o Gene AtAREB1	72
5.3.2	Número de Cópias do Transgene via RT-qPCR e Número de Inserções Via Southern Blotting.....	78
5.3.3	Expressão Relativa de AtAREB1 em Relação ao Gene Endógeno Gm β -actina	85
5.3.4	Análises da Produção de Sementes dos Eventos Obtidos	88
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	92
7.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem estado à frente de inúmeros progressos científicos, gerando crescimento não somente no setor tecnológico, mas por extensão, também no setor econômico (Petherick, 2010). Dentre as políticas que levaram nosso país a esta posição de destaque, se encontra a Nova Lei de Biossegurança (Lei 11.105/05), que regulamenta a pesquisa e a liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), desde que observadas todas as avaliações de risco e tomadas as devidas precauções de biossegurança. Porém, muitos pesquisadores vêem a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão público que presta apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança, como um entrave na pesquisa devido ao excesso burocrático na avaliação e liberação dos OGMs, além de conflitos de interesse, processo que resulta em uma respeitosa fatia comercial entregue nas mãos de muitas multinacionais. Muitos países desenvolvidos usam a tecnologia de recombinar o DNA de acordo com suas respectivas leis há um bom tempo. Aliado aos resultados dos sequenciamentos genômicos de muitas espécies de plantas, esses países têm aplicado este conhecimento na geração de produtos com diversas características desejadas para o plantio, manejo e consumo. No Brasil, além da falta de investimentos significativos em pesquisas que busquem explorar a nossa biodiversidade, houve ainda uma demora considerável na aprovação deste tipo de pesquisa. Nesse ínterim, foi e continua sendo fundamental a pesquisa básica realizada para que se compreenda todas as alterações biológicas que um transgene desencadeia no genoma receptor, buscando principalmente avaliar os possíveis impactos e também desmistificar e compreender as redes regulatórias pelas quais as respostas genotípicas e fenotípicas são manifestadas pós alterações genéticas.

Apesar da soja não ser uma espécie nativa em nosso território, a planta está bem adaptada ao clima brasileiro, tanto que nosso país figura como o segundo maior produtor mundial da oleaginosa. Na safra 2010/11, a produção nacional foi de 75 milhões de toneladas (CONAB, 2011), um recorde que atende não somente a demanda interna decorrente da crescente produção de carnes e do programa nacional do biodiesel, mas também contribui favoravelmente na balança

comercial através do grande volume exportado do grão, gerando de janeiro a setembro de 2011 uma receita de US\$ 20 bilhões (MAPA, 2011).

Entretanto, apesar dos números positivos, fatores bióticos e abióticos podem interferir diretamente na produtividade da cultura, provocando perdas financeiras significativas para os produtores e para a economia do país como um todo. Em 2012, já se fala em um aumento de 10% no preço da soja devido à seca que ocorreu em parte do território nacional, diminuindo em até 20% a produtividade no sul do país (CONAB, 2012). Estes valores não estão isolados, eles refletem negativamente na economia mundial, pois as cotações na bolsa de Chicago, referência para as *commodities* agrícolas, tendem a se elevar devido a esta menor participação da América do Sul nas exportações da soja. O Agronegócio brasileiro é um dos mais pujantes do mundo e possui a tendência de tomar a liderança nas exportações da soja, apesar da safra 2011/2012 ter sido comprometida pela seca. Neste contexto, é estratégico desenvolver pesquisas que busquem diminuir as perdas de produtividade e conseqüentemente diminuir a dependência de um mercado com preços tão voláteis como o das *commodities*.

No âmbito científico, os estudos realizados devem concentrar 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 direcionar suas energias de forma sistêmica sob condições ambientais de seca. A dessecação nos vegetais altera drasticamente seu metabolismo e fisiologia, e se não resultar na morte da planta, pode reduzir significativamente a produtividade. Para responder a este fator abiótico alguns genes são expressos e atuam desencadeando cascatas gênicas que tentam controlar/minimizar o dano causado pelo déficit hídrico. Assim, diferentemente da primeira e da segunda geração de PGMs, que continham genes de resistência a antibióticos/insetos e qualidades nutricionais modificadas, respectivamente, uma nova estratégia designada como a terceira geração de Plantas Geneticamente Modificadas (PGMs), vem sendo utilizada atualmente e objetiva principalmente, transferir genes já caracterizados em plantas modelos para outras espécies de importância agrônômica, como a soja, conferindo-lhes ganho de

funções como a melhor adaptabilidade a ambientes específicos e controle do desenvolvimento.

O fator de transcrição AREB1 (*Abscisic acid-Responsive Element Binding protein – elemento de ligação responsivo ao ácido abscísico*), isolado de *Arabidopsis thaliana* é uma proteína de ligação responsiva ao fitohormônio ácido abscísico (ABA) que atua ligando-se a uma série de outros genes, promovendo sua expressão e levando à diversas respostas de defesa celular vegetal contra a seca. É dentro dessa rede de interações que a tolerância ao estresse deve ser melhor estudada e compreendida. Com este foco e utilizando-se de técnicas de engenharia genética, os pesquisadores serão capazes de prolongar o tempo de tolerância ao déficit hídrico e a eficiência da resposta vegetal para que as plantas possam se adaptar às mudanças climáticas e se recuperar quando uma nova precipitação ocorrer, restaurando assim, uma condição metabólica ideal para dar continuidade ao seu desenvolvimento e reduzindo perdas de produtividade final.

As respostas moleculares das plantas aos estresses abióticos têm sido constantemente descritas na literatura científica como um processo complexo baseado principalmente, na modulação da atividade transcricional de genes estresse-relacionados (Mazzucotelli et al., 2008) e nas suas interações com outras vias de sinalização. Assim como as modificações em nível de RNAs, a fosforilação de proteínas e outras modificações pós- e co-traducionais regulam a ativação de moléculas e genes nativos para assegurar a ação da resposta ao estresse. Estudos recentes revelaram que muitos genes em *Arabidopsis* são *up* regulados por *AREB1* em resposta a seca, alta salinidade e aplicação de ABA, e os dados mostram que a proteína AREB1 pós-fosforilamento pode mediar a expressão temporal e espacial de genes ABA- e estresse-hídrico-responsivos, conferindo maior tolerância à dessecação (Fujita et al., 2005; Furihata et al., 2006; Yoshida et al., 2010).

Diante do apresentado e, dentro do contexto científico atual que busca novas alternativas para amenizar os prejuízos decorrentes da seca, este trabalho objetivou a obtenção de plantas de soja geneticamente engenheiradas com a construção *pBI35S Ω :AtAREB1 (35S:AREB1)* e a caracterização dos eventos obtidos via *Southern blot* e RT-qPCR quanto ao número de cópias e expressão relativa do transgene em condições controle, além da segregação do transgene para a geração T₁.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A SOJA, OS ESTRESSES ABIÓTICOS E A ENGENHARIA GENÉTICA

Considerada fonte de proteínas, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (Sakai; Kogiso, 2008) e fitoestrógenos (Ososki; Kenelly, 2003), a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um grão importante na dieta de grande parte da população mundial. Nos últimos anos, o consumo de produtos à base de soja aumentou significativamente em razão dos efeitos benéficos do grão como a diminuição do colesterol, a prevenção do câncer, diabetes e obesidade (Friedman; Brandon, 2001). A demanda pelo grão também reflete seu uso crescente na produção do biodiesel (Pimentel; Patzek, 2008).

Apesar de não ser uma espécie endêmica no território nacional, este grão está bem adaptado ao clima do Brasil, tanto que nosso país figura como o segundo maior produtor mundial da oleaginosa. A produtividade e a distribuição espacial de importantes culturas podem ser severamente limitadas pelas restrições ambientais, impostas por fatores bióticos e abióticos aos quais os vegetais estão sujeitos. Com a sojicultura não é diferente, fatores abióticos como a alta salinidade, a seca e as temperaturas extremas afetam frequentemente a produção do grão, tornando a produtividade muito variável de ano para ano. Na safra 2010/11, quebrando um recorde nesse setor, a produção nacional foi de 75 milhões de toneladas, um volume que representou um acréscimo de 9,2% ou 6,30 milhões de toneladas à produção obtida na safra anterior (CONAB, 2011). Segundo a CONAB, foi o fator climático que favoreceu a produção. Porém, a história para a safra 2011/2012 será bem diferente. O fator que ajudou a safra anterior vai ser o mesmo que prejudicará a nova safra. Estimativas da CONAB em janeiro de 2012 projetam um aumento de 10% no preço da soja devido à seca que ocorreu em parte do território nacional, diminuindo em até 20% a produtividade no sul do Brasil.

Plantações afetadas por períodos de déficit hídrico podem ter sua produtividade reduzida em até 40% (Tran et al., 2010). E esta não é apenas uma preocupação nacional, pois globalmente, áreas atingidas pela seca estão se expandindo e a expectativa futura é que este problema aumente muito nas próximas décadas (Burke et al., 2006), em decorrência, principalmente, das mudanças

climáticas globais. Em um estudo com simulações múltiplas, Jaggard et al. (2010) estimaram que por volta de 2050, quando a população mundial somará cerca de 9,1 bilhões de pessoas, a concentração de CO₂ no ar será de 550 ppm (partes por milhão), a concentração de O₃ será de 60 ppb (partes por bilhão) e a temperatura global será em média 1,8°C maior que a atual. Estes dados sugerem que a fisiologia das plantas será afetada em menor ou maior escala, sem considerar outras diversas variáveis que também devem ser relevantes, como a diminuição das precipitações pluviométricas. Também fruto das mudanças climáticas, a desertificação de áreas plantadas adiciona mais um ingrediente significativo dentro desta problemática. Em outro estudo, pesquisadores da Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA) e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) mostraram que o café, o arroz, o feijão, o milho e a soja terão suas áreas aptas ao cultivo reduzidas praticamente pela metade, assim que a temperatura média da Terra estiver 5,8°C acima da atual. Segundo os pesquisadores, o aumento da temperatura alterará o regime de chuvas, de evaporação da água e da transpiração das plantas. Ou seja, inúmeras previsões científicas traçam um cenário onde a população mundial terá aumentado significativamente, assim como a necessidade de produzir mais para atender a demanda por alimentos. Ainda neste panorama desfavorável, os pesquisadores terão que lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos interferindo diretamente na produção, e isso em uma área de plantio já sofrida, diminuta e desgastada. Cabe ressaltar que tanto as plantas fotossintetizantes C3 (como é o caso da soja) quanto as C4 devem sofrer os efeitos bioquímicos, fisiológicos e agrônômicos, ainda que de forma um pouco diferente entre si (Pimentel, 2011). Para a soja, por exemplo, o aumento do CO₂ na atmosfera causaria um aumento da fotossíntese e biomassa nas plantas, em contrapartida, o aumento do O₃ anularia esse efeito benéfico do CO₂, levando à perdas significativas nessa cultura (Chameides et al., 2004; Fuhrer, 2009), que somados aos efeitos nocivos de secas mais frequentes e de altas temperaturas, deverão, em conjunto, reduzir a produtividade de várias outras culturas de 10% a 30% nas regiões tropicais (Long et al., 2006), se não mais.

Neste contexto, o uso de diferentes estratégias como a biotecnologia aplicada no campo, o *screening* de germoplasmas para características associadas com tolerância à seca (raízes fibrosas, quantidade de raiz, etc) e a engenharia de

traços genéticos das grandes culturas que alimentam a população serão de grande importância para o futuro, quando será necessário produzir mais em áreas cada vez menores. Estratégias de manejo como plantio direto, irrigação (quando disponível e considerando-se o custo), adubação e outras formas de gerenciar o desenvolvimento das culturas devem estar aliadas ao uso de PGMs mais tolerantes às adversidades ambientais. Dentre as várias estratégias biotecnológicas aplicadas em diversas culturas nos últimos anos e que se encontra em fase de testes para prova de conceito esta o uso do fator de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding – Elemento de ligação responsivo à desidratação*) ou CBF (*C-repeat Binding Factor – Fator de ligação à repetições C*). Este fator se liga a vários genes ABA-independentes que respondem à seca conferindo tolerância ao estresse abiótico através da ativação de um conjunto de vias responsivas que juntas produzem adaptações fisiológicas/moleculares que permitem às células vegetais se adaptarem às situações ambientais desfavoráveis (Hussain et al., 2011).

Na natureza, os vegetais apresentam adaptações ou respostas fisiológicas diferentes aos períodos de seca, dependendo do tempo (rápido ou lento), da intensidade e da duração da desidratação. 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. Porém, nem sempre o genótipo da planta confere respostas prolongadas ao estresse. A chave para se obter sucesso no melhoramento de culturas sob restrições ambientais é entender melhor as mudanças celulares, bioquímicas e toda a maquinaria molecular que participa das respostas ao estresse. O desenvolvimento de plantas geneticamente engenheiradas mais resistentes à insetos, com maior concentração de metabólitos ou mais tolerantes à diversos estresses ambientais (como o caso do *DREB*), tem ajudado muito na compreensão dos mecanismos pelos quais a evolução preparou diversas espécies vegetais para se adaptarem e sobreviverem em ambientes hostis. Porém essa adaptação não foi simples, visto que muitos genes estão envolvidos nesta rede de regulação. O fator de transcrição *AREB* é apenas uma das peças regulatórias que ativam essa cascata de expressão de genes responsivos aos estresses. Através das técnicas de recombinação do DNA, que permitem a inserção de genes exógenos de resposta a diversos estresses no genoma de uma planta selvagem os pesquisadores podem observar comparativamente as respostas dessas PGMs e das

plantas selvagem (sem modificação genética), frente a determinados tratamentos de condições de estresse e assim avaliar se efeitos pleiotrópicos e/ou deletérios interferirão na resposta adaptativa da planta. Para se obter uma PGM, os métodos de transformação genética mais usados atualmente são por transferência indireta (mediada por *Agrobacterium tumefaciens*) ou por transferência direta (Biobalística).

2.1.1 Método de Transformação de Plantas Via Biobalística

Devido à importância econômica dos produtos a base de soja obtidos pela engenharia genética, grandes esforços têm sido direcionados não somente para sua obtenção mas também no desenvolvimento de um sistema que regenere plantas férteis pós-transformação, uma das principais limitações das técnicas de transformação atualmente disponíveis. A principal vantagem para o melhorista do uso da tecnologia dos transgênicos, além da maior rapidez de obtenção, é a possibilidade de transferência de características (genes) de plantas não relacionadas (ou seja, um gene de planta para planta, sexualmente incompatíveis) ou mesmo de animais e microorganismos. No melhoramento convencional, a troca de genes está limitada somente a espécies que são sexualmente compatíveis.

Desde os trabalhos de Hinchey et al. (1988) e McCabe et al. (1988), quando foram obtidas as primeiras plantas de soja transgênicas por transformação via *Agrobacterium* e biobalística, respectivamente, o sistema baseado em aceleração de micropartículas revestidas com o DNA exógeno, apesar de estar sendo gradualmente substituído pela transferência indireta, ainda é uma alternativa muito utilizada na obtenção de diversas culturas GMs. No Brasil, por exemplo, existem cinco aprovações comerciais liberadas de soja com modificações genéticas, sendo quatro delas obtidas via biobalística (CTNBio, 2011). Isso se deve principalmente ao fato da biobalística ser uma metodologia genótipo-independente e mais versátil para a obtenção de PGMs (Altpeter et al., 2005).

Ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens e a escolha da metodologia de transformação deve considerar os objetivos de cada experimento em particular. Por exemplo, através do método de biobalística é possível transferir o cassete de expressão mínimo sem que nenhum vestígio do

vetor seja inserido junto durante o bombardeamento (Breitler et al., 2002; Loc et al., 2002; Romano et al., 2003; 2005). Sabe-se também que o número de cópias inseridas por *Agrobacterium* é menor, característica desejada para estudos de expressão gênica e para o acréscimo de traços vantajosos. Entretanto, quando se considera a integração do(s) transgene(s), independente do método utilizado, o processo parece ser randômico, dependendo do sítio da inserção no genoma e do *background* genético do hospedeiro, assim como da interação do genoma receptor com o gene exógeno (Altpeter et al., 2005). Existe ainda para a transformação genética em soja, uma outra abordagem chamada de sistema de transformação integrado *Agrobacterium* - biobalística (Droste et al., 2000), combinando vantagens de ambos os protocolos. Porém esta metodologia trabalha com embriões somáticos, processo relativamente complicado para adaptações de protocolo à curto prazo.

Em resumo, no Brasil, o sistema de transformação via *Agrobacterium* em soja ainda é limitado, requerendo otimizações para se tornar uma técnica eficiente, rápida e reproduzível em qualquer variedade. Assim, o uso da transferência direta de genes de interesse via biobalística elimina alguns problemas encontrados em outros sistemas de transformação genética e consiste basicamente em um processo físico de aceleração de micropartículas desenvolvido por Sanford e colaboradores (1987), que insere o DNA de interesse envolto em pequenas partículas de metal (ouro ou tungstênio) em células ou tecidos alvos. As partículas são aceleradas através de equipamentos diversos, com pressão de gás ou descarga elétrica, e atravessam a parede celular e a membrana plasmática. Quando as partículas recobertas de DNA entram em contato com as organelas celulares e com o núcleo da célula vegetal, o líquido celular carrega as partículas deixando livre o material genético, que pode então ser incorporado, ao acaso, nos cromossomos tornando-se parte do material genético da célula receptora, e sendo transmitido adiante pós-fecundação, para a geração seguinte.

2.1.2 Caracterização Molecular de PGM's

2.1.2.1 Técnicas para quantificação do transgene inserido

Para que o sucesso no processo de obtenção de uma PGM ocorra, depois de inserido no genoma hospedeiro, o transgene deve ser expresso. Isto depende essencialmente, do local de inserção e da posição (isoladas, em tandem, rearranjos, duplicações, etc) e quantidade de cópias inseridas. Atualmente uma das técnicas mais utilizadas para a quantificação inicial do número de cópias de um transgene inserido em um genoma qualquer é a Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). Considerando-se que geralmente os trabalhos são desenvolvidos com muitos eventos, esse seria um método para realizar um *screening* inicial dos eventos gerados e assim continuar a pesquisa com eventos contendo um menor número de cópias inseridas.

Dentre as metodologias disponíveis para realizar a reação de RT-qPCR, os ensaios com *TaqMan* (Holland et al., 1991) são considerados os de maior confiabilidade, pois utilizam uma sonda de DNA fluorescente que se hibridiza à sequência alvo entre os *primers forward* e *reverse* específicos garantindo uma eficiência de aproximadamente 60% de anelamento e amplificação do gene alvo. Outra metodologia muito utilizada é o uso do agente intercalante *SYBR Green*[®]. Este fluoróforo (*dye*) intercalante possui alta afinidade pela molécula de fita dupla de DNA, emitindo pouca fluorescência em solução, mas quando ligado ao DNA fita dupla emite um forte sinal (luz). Assim, com o acúmulo do produto amplificado na PCR, a fluorescência aumenta proporcionalmente e é então detectada. É um método simples e econômico, pois não necessita da síntese de sondas específicas; e bastante prático e sensível, podendo ser utilizado em laboratório para análise de um grande número de genes.

Para o cálculo da quantificação da expressão gênica por RT-qPCR, pode-se optar pela quantificação absoluta através de curvas-padrão, que determina o número exato de moléculas ou cópias do fragmento alvo; ou pela quantificação relativa pelo método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta Ct}$), normalmente utilizado para quantificação dos níveis de expressão gênica.

Para determinar o número de cópias do transgene através da quantificação relativa, o gene alvo é comparado ao número de cópias de um gene endógeno que tem seu número de cópias na espécie em estudo determinado e, preferencialmente, que apresente baixo número de cópias. Deste modo, o número de cópias do gene alvo é determinado em relação a um gene endógeno que pode funcionar como próprio calibrador na própria amostra, ou ainda utilizar uma amostra não transgênica como calibradora (Marcelino, 2006). O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (Ct) e determina o ponto exato da emissão de fluorescência, que gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. A emissão da luz pelos compostos fluorescentes (moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específico) geram valores de fluorescência que são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade do produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados para esta metodologia são o intercalante *SYBR Green*® e a sonda de hidrólise *TaqMan*® (Novais et al., 2004).

Apesar da técnica de RT-qPCR determinar o número de cópias de forma precisa, o procedimento não é à prova de erros. Dessa forma, seu uso deve ser visto como complementar - ao invés de em substituição - a outros métodos convencionais de análises, como a técnica de *Southern blot* (Southern, 1975). Feito o *screening* inicial via RT-qPCR, os resultados obtidos para os eventos testados devem ser então validados pelo método de *Southern*. Esta técnica permite de fato que o(s) transgene(s) inserido(s) se hibridize(m) com uma sonda de DNA complementar. Utilizando esta técnica ainda é possível discorrer a respeito de outras informações como a zigosidade do evento assim como o tipo da inserção (cópias em tandem, duplicações, rearranjos), uma vez que as bandas obtidas após a revelação podem não ser correlatas ao esperado e também aos dados obtidos via RT-qPCR, principalmente se houver rearranjos.

2.1.2.2 Método comparativo ΔCt para quantificação relativa da expressão do gene de interesse

A quantificação relativa pode ser realizada pelo método da curva padrão ou empregando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Inicialmente, é necessário que se valide o

experimento para demonstrar que as eficiências de amplificação do alvo e da referência interna sejam próximas. Isto deve ser realizado para qualquer tipo de quantificação em PCR em tempo real (Livak; Schmittgen, 2001). Com isso, utilizando esta fórmula pode-se inferir a quantidade do gene alvo, normalizada para uma referência endógena e em relação ao calibrador. O calibrador pode ser uma amostra alvo previamente caracterizada com uma cópia do gene homozigota (ou duas cópias alélicas), ou o próprio gene endógeno usado para normalização, descartando assim o uso de um calibrador conhecido. Desta última forma, o número de cópias do gene alvo é determinado em relação ao gene endógeno que funciona como próprio calibrador nas amostras (Marcelino, 2006). Logo, não se usa o $\Delta\Delta Ct$, mas sim o ΔCt , uma derivação da fórmula inicial de Livak e Schmittgen (2001).

Pode-se também verificar a expressão do transgene pela metodologia de *Northern blot*, indicado principalmente para tratamentos sob diferentes níveis de estresses nas plantas geradas, ou como uma técnica complementar.

2.1.3 Análises Quanto à Inserção, Transmissão e Estabilidade do Transgene

2.1.3.1 Número de cópias e zigosidade

O número de cópias inseridas do transgene pode ser definido como o número de inserto(s) do DNA exógeno no genoma hospedeiro (planta transformada). Se o fragmento exógeno se inserir apenas uma vez em um *locus* simples do genoma, este é considerado um evento transgênico de cópia única. Porém, este conceito de cópias pode ser um pouco confuso se considerado que ele é também muito correlato a outro conceito, a zigosidade. Além disso, existe a possibilidade da inserção de cópias em tandem (truncadas ou completas) do gene exógeno. Após a autofecundação e segregação, se essa simples inserção/cópia existir como dois alelos idênticos nos cromossomos homólogos do organismo receptor, esta seria uma linhagem GM homozigota com duas cópias alélicas do transgene (provindas de um inserto), geralmente dito como uma cópia. Se por outro lado existir uma cópia simples em apenas um dos cromossomos homólogos, seria uma linhagem hemizigota (apenas uma cópia do alelo) com uma cópia alélica do

transgene, também dito como uma cópia. Comumente encontramos o termo cópia na literatura sem distinção da zigosidade do organismo, o que pode induzir muitos erros de interpretação real do número de cópias presentes em seu genoma. Deve-se, portanto, conhecer a zigosidade do evento ou pelo menos ter uma estimativa pela análise da proporção da segregação e/ou dados de *Southern blot* ou RT-qPCR para se inferir com mais convicção quantas cópias realmente o organismo engenheirado possui.

Não existe uma classificação para esta abordagem, sendo que neste trabalho decidimos adotar os termos cópia e inserto independente se o transgene está completo (com a construção inteira) ou não. Esse dado pode ser obtido pelas ampliações via PCR previamente à etapa de cálculo do número de cópias, caso os *primers* estejam desenhados dentro do cassete de expressão. Na geração transformada, inclusive, ambos os termos possuem o mesmo significado, visto que somente um dos alelos se integrará no genoma hospedeiro. Dessa forma, tanto o número de cópias quanto a zigosidade são conceitos importantes em estudos genéticos que buscam caracterizar a função gênica (Yuan et al., 2007), sendo essenciais para entender o comportamento do gene inserido assim como sua transmissão para as gerações posteriores.

2.1.3.2 Integração, herança e silenciamento

A integração do transgene em um locus Mendeliano simples, independente do número de cópias é frequentemente observada tanto em transformações diretas quanto indiretas. Múltiplas cópias completas e/ou parciais do transgene herdadas com traços Mendelianos digênicos ou multigênicos também foram observados. Entretanto, a segregação não-Mendeliana ocorre entre 10 a 50% das linhagens GMs obtidas, devido tanto a transmissão instável do transgene como também a sua baixa expressão gênica (Yin et al., 2004). Apesar de múltiplas cópias do transgene possivelmente serem integradas, elas geralmente co-segregam como um locus transgênico. Ou seja, eles geralmente se integram em loci muito próximos ou no mesmo locus (Pawlowiski & Somers, 1996).

Devido ao fato do locus transgênico ser hemizigoto na planta transformada e a maioria dos transgenes de interesse promoverem um ganho de

função nas plantas, eles se comportam como genes dominantes e uma proporção de segregação de 3:1 do transgene para o tipo selvagem é normalmente esperado em plantas diplóides e poliplóides diploidizados, como é o caso da soja.

Fatores que modificam a expressão do transgene irão obviamente refletir na distorção da proporção de segregação. Plantas transgênicas derivadas de bombardeamento de micropartículas tendem a apresentar múltiplas cópias (Romano et al., 2005), o que pode tornar a inserção um pouco instável e levar à perda ou ao silenciamento desses genes inseridos. Embora não esteja totalmente compreendido, o mecanismo de silenciamento gênico pode ocorrer pelo bloqueio da transcrição (TGS – *Transcriptional Gene Silencing* – *Silenciamento gênico transcricional*), pela degradação do mRNA (PTGS – *Post-Transcriptional Gene Silencing* – *Silenciamento gênico pos-transcricional*), e ainda possivelmente por outras formas de silenciamento (Reedy et al., 2003). O TGS é herdado meioticamente e está correlacionado com modificações no DNA como mudanças locais na estrutura da cromatina (Wallrath, 1998) e/ou pela hiper-metilação dos promotores dos genes silenciados (Ng; Bird, 1999). Diferentemente, PTGS não é herdado pela meiose e precisa ser reestabelecido em cada geração. Acredita-se que o PTGS seja um mecanismo de defesa celular ancestral contra transgenes, vírus (VIGS – *Virus-Induced Gene Silencing* – *Silenciamento gênico induzido por vírus*) e transposons, que ocorre no citoplasma e está associado ao aparecimento de fragmentos específicos de RNA de baixo peso molecular, os siRNAs (*Small Interference RNAs* – *pequenos RNAs de interferência*) (Hamilton; Baulcombe, 1999; Zamore, 2001). Os siRNAs são guiados pelas proteínas ARGONAUTAS (*ARGONAUTE-like*) que servem como componentes centrais de um complexo chamado complexo de silenciamento RNA-induzido (*RISC* – *RNA-induced silencing complex*) que utiliza os pequenos RNAs como guias para o silenciamento de sequências específicas de RNA mensageiro complementares às sequências dos siRNAs, induzindo enzimaticamente a degradação do mRNA ou impedindo sua tradução (Baulcombe, 2004; Jinek; Doudna, 2009). Todos estes mecanismos de silenciamento podem, no entanto, serem um pouco mais complicados. Fagard e Vaucheret (2000) demonstraram a ocorrência de uma variação enorme de mecanismos através dos quais o transgene pode levar ao TGS ou PGTS, sendo ele mesmo alvo e/ou fonte do silenciamento.

Alguns estudos demonstraram também que a metilação do DNA e a estrutura da cromatina tem um papel importante no silenciamento transcricional e pós-transcricional. Nesta forma de silenciamento, a região promotora e, às vezes, a região codante dos transgenes silenciados apresentam-se densamente metiladas (Kooter et al., 1999). Plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene da proteína DDM1, que participa na remodelação da cromatina, não apresentaram o silenciamento gênico, indicando um possível papel da metilação do DNA e da estrutura da cromatina no estabelecimento e na manutenção do PTGS (Wassenegger, 2000).

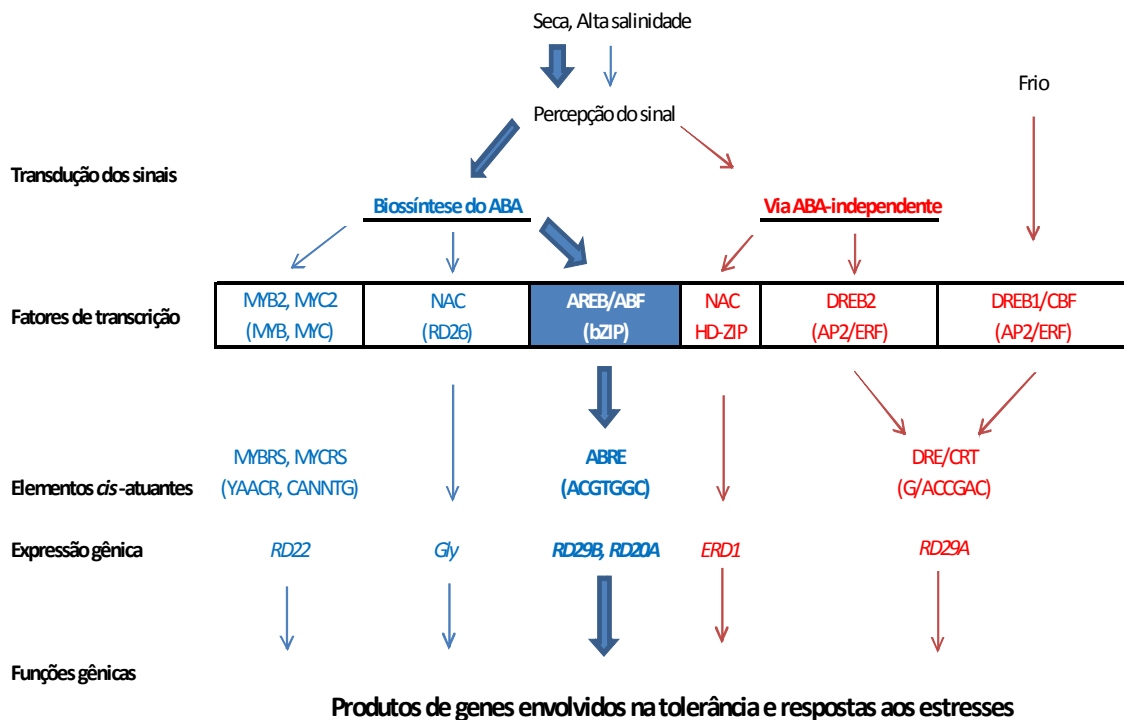
A eliminação do transgene é um fenômeno fortemente associado à transmissão fiel do mesmo, entretanto, foi pouco estudada em plantas transgênicas comparado com outros fenômenos como o silenciamento (Waterhouse & Helliwell, 2003).

2.2 DA PERCEPÇÃO DA SECA ÀS RESPOSTAS MOLECULARES, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DECORRENTES DA EXPRESSÃO GÊNICA

Por ser um organismo sésil, as plantas não podem fugir de um ataque de parasitas ou de uma situação de estresse ambiental. O desenvolvimento de mecanismos morfológicos, anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares durante a evolução foi a principal defesa vegetal a estes desafios, e sabe-se atualmente que estas respostas são resultado de uma rede bastante complexa com característica poligênica. Quando uma planta é submetida a um estresse abiótico, por exemplo, um grande número de genes são ativados e expressos, resultando em um acúmulo nos níveis de muitos metabólitos e proteínas, alguns dos quais responsáveis por conferir um grau maior de proteção ao estresse imposto (Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Essa é uma característica relevante quando se pensa em estratégias de engenharia genética, visto que pode se tornar uma barreira nas respostas da planta engenheirada. Ou seja, uma PGM deve possuir um nível adequado de expressão do transgene, sem que isso interfira em outras vias metabólicas como as vias de crescimento e produtividade. Além disso, devem promover a expressão conjunta de outros genes da mesma cascata, ativando redes regulatórias pertinentes às defesas contra o estresse.

Dentre os estresses abióticos, a condição de seca desencadeia entre outras respostas vegetais, a produção do fitohormônio ácido abscísico (ABA), que se liga a regiões específicas nos promotores de genes estresse-relacionados, induzindo sua expressão. Muitos genes induzidos por seca são induzidos também por tratamento com ABA exógeno, enquanto outros não são ativados pelo hormônio. De fato, existe a presença de dois sistemas regulatórios gerenciando a expressão gênica ativada pela seca: a via ABA-independente e a via ABA-dependente (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Os elementos regulatórios *cis* atuantes e *trans* atuantes presentes em ambas as vias já foram analisados em níveis moleculares, e estão divididos em cerca de seis vias de transdução de sinais em resposta aos estresses hídrico, salinidade e baixa temperatura: três vias são ABA-dependentes e três vias são ABA-independentes. Na via ABA-dependente, os fatores de transcrição AREBs/ABFs (*A*bscisic acid-*R*esponsive *E*lement *B*inding proteins/*A*BRE-*B*inding *F*actors – elementos de ligação responsivos ao ABA/ fatores de ligação ao ABRE) possuem um domínio Zíper de leucina básico (bZIP) envolvido neste processo (Figura 1).

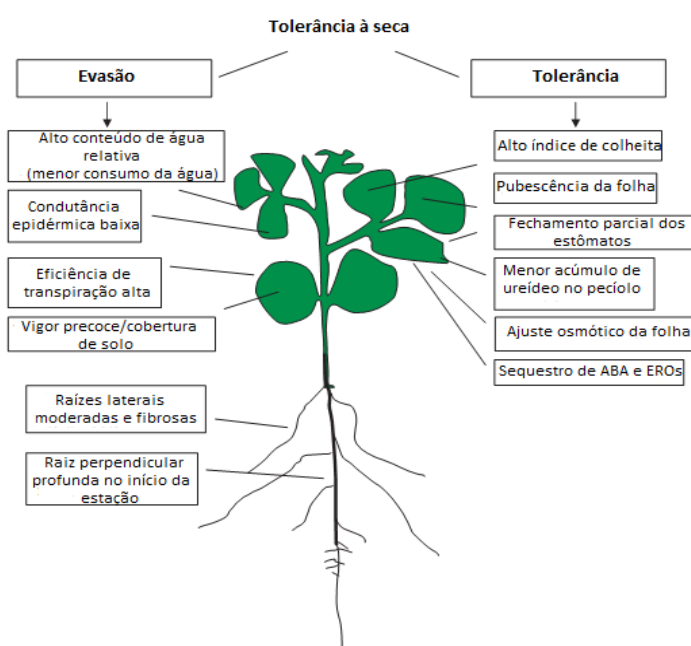
Fig. 1 – Redes de regulação transcricional dos sinais de estresse abiótico e expressão gênica.



Existem cerca de seis vias de transdução de sinais em resposta aos estresses hídrico, salinidade e baixa temperatura: três vias são ABA-dependentes (em azul) e três são ABA-independentes (em vermelho). Na via ABA-dependente, os ABREs (*ABA-Responsive Elements – Elementos ABA responsivos*) funcionam como o elemento *cis* ABA-responsivo. Os AREB/ABFs são os fatores de transcrição com domínio Zíper de leucina básico (bZIP) envolvidos neste processo. Em vermelho, via de resposta aos estresses de seca, alta salinidade e frio, ABA – independente. Adaptado de Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007).

De modo geral, as respostas resultantes destas vias de percepção se apresentam divididas em três grupos: escape, evasão e tolerância à seca (Turner et al., 2001). Na figura 2 estão representados alguns mecanismos fisiológicos e fenotípicos observados na soja quando submetida a condições de deficiência hídrica.

Fig. 2 – Características fisiológicas e anatômicas associadas à tolerância a seca em soja. ABA, Ácido Abscísico; EROs, Espécies Reativas de Oxigênio. Adaptado de Manavalan et al. (2009).



Existem cultivares de soja melhoradas convencionalmente capazes de “fugir” da seca, ou seja, esse genótipo é capaz de escapar da insuficiência hídrica antes dela acontecer, simplesmente acelerando, encurtando e completando seu ciclo de vida (estágio reprodutivo) enquanto ainda há disponibilidade de água (Heatherly & Elmore, 2004). Um segundo mecanismo de resposta vegetal ao déficit

hídrico é a evasão da seca, que envolve a estratégia de manter níveis altos de água durante períodos de estresse, seja pela maior eficiência na absorção d'água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. O terceiro mecanismo, tolerância à seca, permite à planta manter seu turgor e continuar seu metabolismo mesmo em baixo potencial hídrico, estratégia alcançada pela tolerância protoplásmica através da síntese de osmólitos, osmo-protetores ou solutos compatíveis (Nguyen et al., 1997; Mitra, 2001), sendo que grande parte dessas respostas são mediadas pelo ABA.

2.3 O VERSÁTIL HORMÔNIO ÁCIDO ABSCÍSICO

O fitohormônio ácido abscísico (ABA) é o regulador central da tolerância à estresses abióticos em plantas, coordenando uma complexa rede regulatória que possibilita às plantas a sobrevivência em condições de baixa disponibilidade de água (Cutler et al., 2010; Kim et al., 2010). O ABA também tem papel importante durante o desenvolvimento da planta, incluindo fases embrionária e germinativa, e na dormência de sementes (Finkelstein et al., 2008). Na fase germinativa (na desidratação celular durante a maturação de sementes) e também na fase de crescimento vegetativo, ocorre a indução para a síntese e acúmulo de ABA endógeno, que controla um grande número de genes envolvidos na desidratação e no crescimento. A expressão desses genes é regulada principalmente por duas famílias de proteínas bZIPs, ABI5 nas sementes e AREBs no estágio vegetativo (Fujita et al., 2011). O hormônio também controla as respostas para estresses osmóticos durante o desenvolvimento, e ainda está envolvido na expressão de genes ligados ao ritmo circadiano e condições de luz, acumulando nas células vegetais em um padrão diurno, dependente de luz (Nováková et al., 2005).

Sob condições de seca ou estresse salino, o conteúdo de ABA na planta aumenta significativamente estimulando o fechamento estomático, mudanças na expressão de genes regulados pelo ABA como proteínas envolvidas na embriogênese tardia (proteínas LEA – *Late Embryogenesis Abundant*); proteínas regulatórias diversas como os fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases; uma variedade de transportadores; e enzimas envolvidas na síntese osmoprotetora, sinalização fosfolipídica, metabolismo de ácidos graxos,

metabolismo celular, metabolismo de carboidratos e metabolismo secundário; mecanismos que aumentam a capacidade do vegetal em tolerar condições de estresse hídrico (Seki et al., 2007; Cutler et al., 2010; Kim et al., 2010). Assim, dada a importância do ABA no desenvolvimento e fisiologia da planta e nas respostas vegetais a estresses ambientais, o entendimento dos processos que compreendem desde a transdução de sinais do hormônio até os mecanismos de respostas desencadeados por ele são foco de muitas pesquisas básicas e avançadas, tanto para o ABA intra- como intercelular (Umezawa et al., 2010).

2.3.1 Avanços Recentes na Pesquisa da Via de Sinalização ABA-Dependente

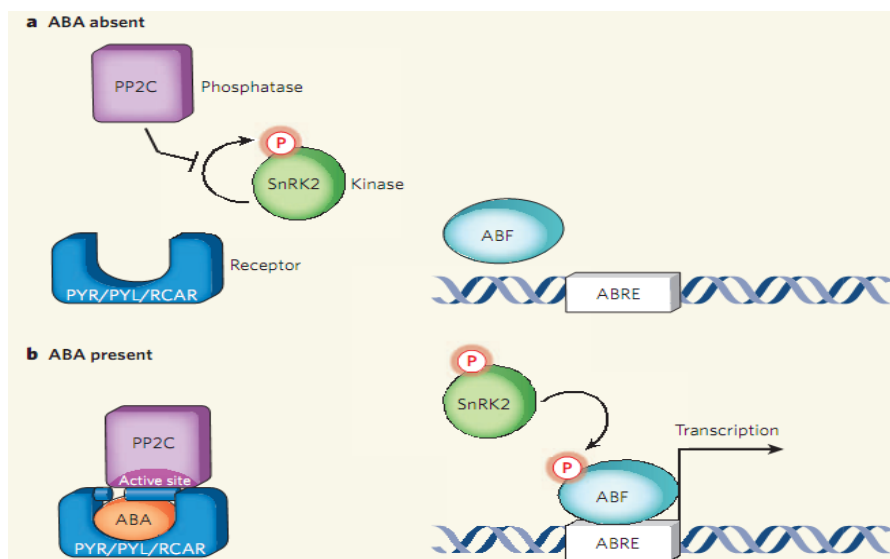
Antes de 2009, o conhecimento celular e molecular das respostas básicas do ABA era bastante incompleto. Nesta época, alguns fatores relacionados ao hormônio já haviam sido identificados (Cutler et al., 2010), como FCA, Ch1H, *G-Protein-Coupled receptors* (GCR2, GTG1/2) e Mg-chelatase (ABAR), no entanto restava saber como eles regulavam as respostas do ABA nas plantas. Essa situação mudou graças a alguns trabalhos recentemente publicados, que proporcionaram um grande salto no entendimento do modelo da via de sinalização do ABA. Esta elucidação deu-se por dois grandes avanços: (I) a descoberta das proteínas START PYR/PYL/RCAR (*Pyrabactin resistance 1 / Pyrabactin resistance 1-like / Regulatory Component of ABA Receptor 1*) como um novo tipo de receptor solúvel do ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009); e (II) a identificação de um complexo de proteínas fosfatase-quinase, PP2C - SnRK2 (*type 2C protein phosphatase – SNF1-related protein kinase 2*), como componentes *downstream* de PYR/PYL/RCAR (Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009). Finalmente, estudos estruturais comprovaram inteiramente este modelo (Melcher et al., 2009; Miyazono et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Santiago et al., 2009; Yin et al., 2009).

2.3.2 Mecanismos Centrais da Sinalização ABA-Dependente

Alguns estudos paralelos no ano de 2009 indicaram um sistema de regulação duplo-negativo na sinalização do ABA, composto de 4 estágios principais: proteínas START (PYR/PYL/RCAR), proteínas fosfatases (PP2C), proteínas

quinases (SnRK2) e seus alvos *downstream* (Fujii et al., 2009; Umezawa et al., 2009). Neste modelo, as PYR/PYL/RCARs agem como receptores do ABA, as PP2Cs como reguladores negativos da via, e as SnRK2s como reguladores positivos da sinalização *downstream* (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Uma via regulatória duplo-negativa foi assim estabelecida, onde as proteínas START PYR/PYL/RCAR se ligam ao ABA inibindo a atividade da fosfatase PP2C, e as PP2Cs inativam as SnRK2s (Park et al., 2009; Umezawa et al., 2009; Vlad et al., 2009). Na ausência de ABA, as PP2Cs são ativadas e reprimem a atividade das SnRK2 e a posterior sinalização *downstream*. Na presença de ABA, as PYR/PYL/RCARs interagem com as PP2Cs e inibem a atividade da fosfatase, permitindo a ativação da SnRK2, que fosforila suas proteínas alvos (Figura 3), como o fator de transcrição AREB1, que está localizado no meio da cascata de resposta dependente do ABA. AREB1 também é alvo de outras proteínas quinases. Esse novo modelo de sinalização respondeu muitas dúvidas, entretanto constitui a base para que se realizassem novos questionamentos, pois ainda há muito a ser esclarecido.

Fig. 3 – Via de sinalização ABA-dependente mínima.



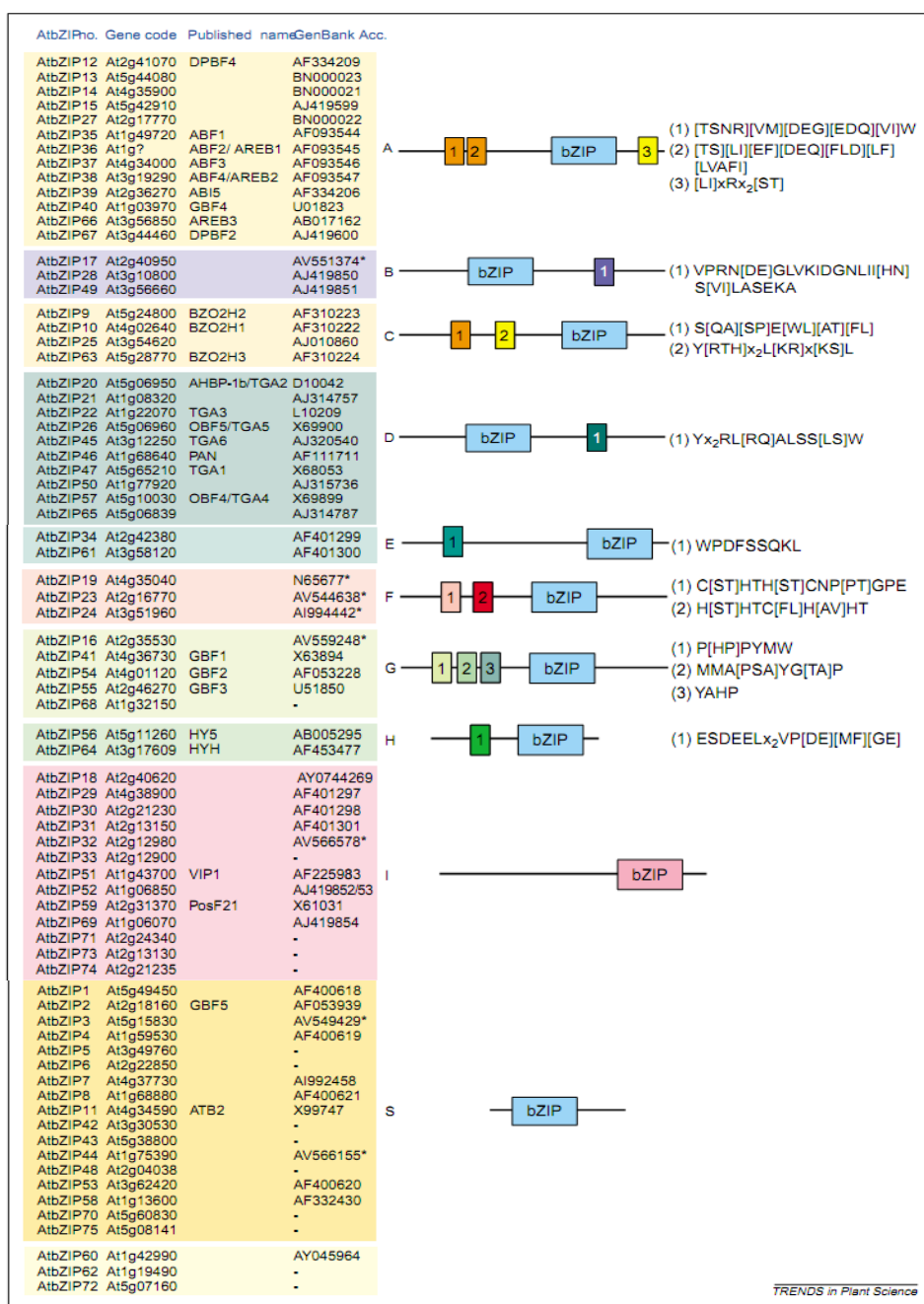
a) Na ausência de ABA, a fosfatase PP2C está livre para inibir a autofosforilação da família de quinases SnRKs. **b)** A presença do ABA permite que a família de proteínas PYR/PYL/RCAR se ligue e sequestre a fosfatase, que deixaria de se ligar às quinases. A quinase deixa de ser inibida pela fosfatase, 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 (ABREs) (Sheard; Zheng, 2009).

2.4 PROTEÍNAS bZIPs E OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO AREBs/ABFs

Durante seu ciclo de vida, as plantas podem enfrentar muitos estresses abióticos e uma das estratégias moleculares vegetais para se adaptarem melhor às condições ambientais adversas é a regulação da expressão de um grande número de genes responsivos aos estresses. Estudos recentes confirmaram que algumas classes de fatores de transcrição com domínios zíper de leucina básico (bZIP) estão entre esses genes de regulação que desempenham papéis fundamentais na tolerância aos estresses de salinidade, frio, calor e seca (Choi et al., 2000; Liao et al., 2008a), além de estarem envolvidos em muitos outros aspectos centrais do desenvolvimento, como a fotomorfogênese, a formação de folhas e sementes e a homeostasia de energia (Corrêa et al., 2008).

cDNAs de *Arabidopsis* codificando fatores de transcrição bZIP, nomeados de *AREB* ou *ABF* foram isolados em leveduras pelo sistema de varredura duplo-híbrido (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). No genoma de *Arabidopsis* existem de 75 a 77 fatores de transcrição bZIPs divididos em 13 grupos (do grupo A ao L, e S), de acordo com seus domínios bZIPs e similaridades entre os *motifs* conservados (Corrêa et al., 2008). Desses grupos, 13 proteínas são classificadas como pertencentes à subfamília de *AtAREBs/AtABFs* e apresentam 3 domínios conservados (Figura 4, Grupo A), sendo dois na região N-terminal e um na região C-terminal (Jakoby et al., 2002; Corrêa et al., 2008).

Fig. 4 – Classificação das proteínas bZIPs de *Arabidopsis thaliana*.



Os grupos foram nomeados com letras se referindo a alguns de seus principais membros (A para AREBs/ABFs/ABI5, C para CPRF2-lie, G para GBF, H para HY5), ao tamanho da proteína (B para *big* e S para *small*), ou alfabeticamente. Genes que não se enquadraram em nenhum grupo ficaram não-classificados no fim da figura. O domínio bZIP está representado pela caixa azul, exceto para o grupo I, representado em rosa. Caixas laranjas indicam potenciais sítios de fosforilação de caseína quinase II (S/TxD/E, onde x representa qualquer aminoácido), domínios 1, 2 e 3 no grupo G são parte do domínio de ativação rico em prolina (Jakoby et al., 2002).

Corrêa et al. (2008) publicaram uma classificação mais atualizada sobre a evolução dos fatores bZIPs de plantas, no entanto para fins didáticos a classificação de Jakoby et al. (2002) foi adotada neste trabalho, e nesta abordagem os dados sobre o grupo onde *AREB1* está inserido em *Arabidopsis* são os mesmos

quando comparados com a outra classificação. O grupo A surge primeiramente em termos evolutivos no ancestral comum mais recente das espermatófitas, plantas que produzem sementes, e foi recrutado não só para o desenvolvimento das sementes ou germinação, mas também para o “ajuste-fino” das respostas à desidratação e ao estresse salino (Corrêa et al., 2008). Esta subfamília (Grupo A) dos fatores bZIPs é composta por 9 homólogos no genoma de *Arabidopsis*, e foi observado que *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* e *ABF3* são expressos principalmente em resposta a desidratação e a alta salinidade em tecidos vegetativos, mas não em sementes, mostrando que membros de um mesmo grupo podem ter padrões de expressão similares e compartilhar funções (Fujita et al., 2005). Neste mesmo estudo (Fujita et al., 2005), plantas de *Arabidopsis* transgênicas superexpressando uma forma ativa do gene *AREB1* (*AREB1ΔQT*) mostraram hipersensibilidade ao ABA (não necessitaram da presença do fitohormônio) e maior tolerância à seca, ao passo que *AREB1* (e também *AREB2* e *AREB3*) sem modificação na proteína precisaram do ABA para sua completa ativação. Ainda, oito genes representando dois grupos de proteínas (funcionais e regulatórias) foram *up* regulados: genes da classe LEA e genes regulatórios estresse- e ABA-induzidos.

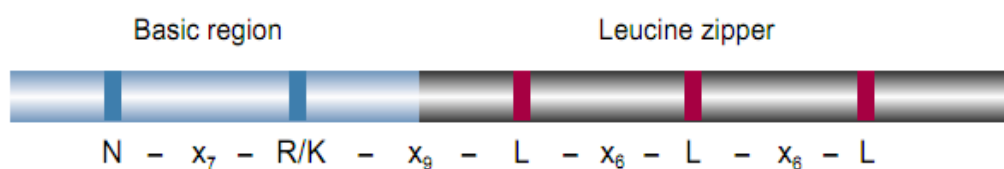
Foi observado também que *AREB1* funciona como um pré-requisito para a regulação do crescimento de plântulas e resposta à glicose, conferindo tolerância a diversos outros estresses, como salinidade, calor e estresse oxidativo, sugerindo que esse fator de transcrição tem um papel fundamental na adaptação aos estresses ambientais (Kim et al., 2004; Fujita et al., 2005). Sabe-se que muitos genes responsivos à seca, salinidade e frio são também responsivos à aplicações de ABA exógeno (Kang et al., 2002). Entretanto, alguns genes induzidos por estresse hídrico não foram induzidos pelo tratamento com ABA exógeno, indicando que tanto o sistema da via ABA-dependente quanto o da via ABA-independente estão envolvidos na expressão gênica estresse-responsivas (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2000). É importante observar que a tolerância ou susceptibilidade de um genótipo para estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, sendo esperado que a planta apresente múltiplas percepções do estresse e das vias de transdução dos sinais, que ainda podem se inter cruzar em muitos pontos das diversas vias regulatórias (Chinnusamy et al., 2004).

Quando a planta acumula ABA em suas células devido a um estresse ambiental, a expressão de muitos genes ABA-responsivos é induzida (Seki et al., 2002), e analisando as regiões promotoras desses genes, observou-se que para sua expressão são necessários múltiplos elementos *cis* ABRE, com a sequência conservada PyACGTGG/TC, ou a combinação de um elemento ABRE com um elemento complementar CE (*Coupling Elements*) (Zhang et al., 2005; Gomez-Porras et al., 2007). Pelo menos dois ABREs ou um ABRE e mais um CE constituem o complexo ABA-responsivo (Nakashima et al., 2009). Os CEs conhecidos são muito similares ao ABRE, e em *Arabidopsis*, a sequência DRE/CRT (*Dehydration-Responsive Element/C-Repeat*), ou o elemento *cis* dos promotores dos genes induzidos por DREB/CBF (*Dehydration-Responsive Element Binding protein / C-repeat Binding Factor*), podem servir como um CE de ABRE em resposta ao ABA (Narusaka et al., 2003), sugerindo a existência de uma interação entre os *regulons* de DREB e *regulons* de ABRE. Até o momento, também o CE1, o CE3 e o *motifIII* foram identificados como CEs (Fujita et al., 2011). E recentemente, Lee et al. (2010) demonstraram que DREB1A, DREB2A e DREB2C podem interagir com proteínas AREBs, controlando a expressão de genes ABA-responsivos.

As proteínas AREBs possuem uma região com um domínio básico de ligação ao DNA, composto de 20 aminoácidos em N-terminal, e um domínio de zíper de leucina, composto por sete aminoácidos em C-terminal (Figura 5). Esses sete aminoácidos formam uma estrutura zíper de leucina composta de uma dupla α -hélice hidrofílica (Figura 6), e após a dimerização, levam a proteína a interagir com os elementos *cis* ABA-responsivos ABREs (Py-ACGTGG/TC) dos genes *downstreams* induzidos pelo estresse de seca (Guiltinan et al., 1990). Estudos posteriores confirmaram sua ligação aos promotores contendo ABRE *in vitro* e *in vivo* (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). Modificações pós-traducionais ABA-dependentes também são necessárias para que os genes alvos sejam totalmente ativados (Fujita et al., 2005; Furihata et al., 2006). Experimentos analisando os níveis de expressão de AREB1, AREB2 e ABF3 em protoplastos de mesófilos de folhas de *Arabidopsis*, mostraram que essas proteínas induziram uma elevada expressão do gene repórter RD29B-GUS na presença de ABA quando comparada com aquela na ausência de ABA, enquanto que a expressão de uma forma constitutiva ativa de AREB1, AREB1 Δ QT, mostrou acentuada ativação do gene

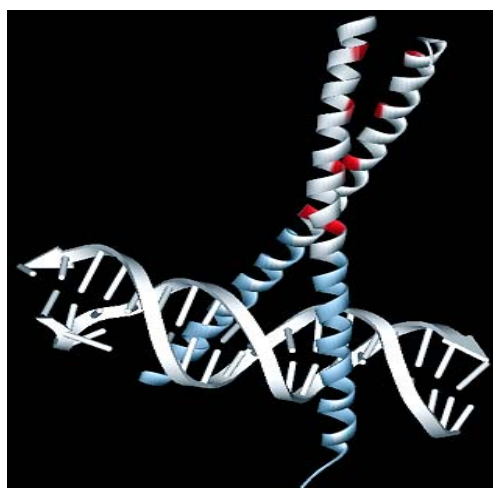
repórter mesmo na ausência de ABA (Yoshida et al., 2010). Neste mesmo estudo, resultados similares também foram encontrados com ortólogos dos *AREBs*, *OsAREB1*, *OsAREB2* e *OsAREB8* em protoplastos de mesófilos de arroz. Esses dados mostraram que os fatores de transcrição *AREBs/ABFs* necessitam de ABA exógeno para sua completa ativação tanto em *Arabidopsis* quanto em arroz, plantas consideradas modelos para estudos genômicos das dicotiledôneas e monocotiledôneas, respectivamente. Quanto aos moduladores negativos ao nível de proteína dos *AREBs*, nada foi identificado até o momento (Fujita et al., 2011).

Fig. 5 – Estrutura primária dos domínios em fatores bZIP.



Os resíduos altamente conservados estão destacados com caixas azuis e vermelhas, com sua sequência consenso abaixo. As leucinas são repetidas a cada 7 aminoácidos, e são por vezes substituídas por isoleucina, valina, fenilalanina ou metionina (Jakoby et al., 2002).

Fig. 6 – Estrutura tridimensional das proteínas bZIPs ligadas aos seus *cis* elementos no DNA.



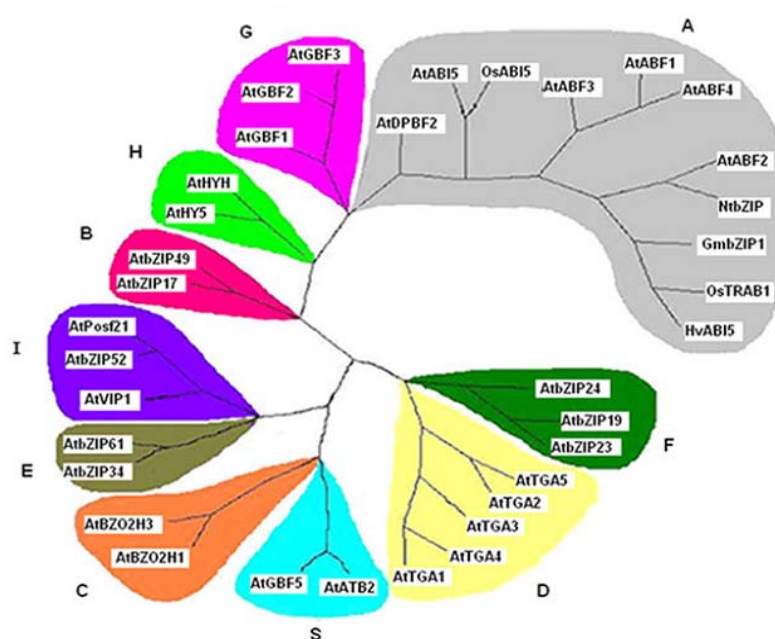
Os resíduos de leucina estão posicionados em um lado de cada α -hélice, formando a super-hélice (*coiled coil*) por interações van der Waals (Jakoby et al., 2002).

Fatores *AREBs* homólogos foram descobertos em outras espécies de plantas, como DPBF em girassol (Kim et al., 1997), TRAB1 em arroz (Hobo et al., 1999) PKABA1 em trigo (Johnson et al., 2002), HvABI5 em cevada (Casaretto; Ho, 2003) e recentemente SIAREB em tomate (Hsieh et al., 2010) e GmbZIP1 em soja (Gao et al., 2011).

2.4.1 *GmbZIP1*, o Ortólogo de *AtAREB1* da Soja

No genoma da soja, 176 fatores de transcrição do tipo bZIP foram encontrados (Schmutz et al., 2010), porém apenas 5 estão caracterizados. Liao et al. (2008a) isolaram três genes de fatores bZIPs de subfamílias não-AREBs: *GmbZIP44*, *GmbZIP62* e *GmbZIP78*, pertencentes aos subgrupos S, C e G, respectivamente, que funcionam como reguladores negativos na sinalização ABA e conferem tolerância à salinidade e ao frio em plantas de *Arabidopsis* transgênicas. O quarto fator de transcrição isolado foi o *GmbZIP132*, induzido em tratamentos sob seca e alta concentração salina, podendo estar mais relacionado à dormência de sementes, visto que a maior expressão foi observada em cotilédones (Liao et al., 2008b). Em 2011, Gao e colaboradores isolaram um quinto e novo fator bZIP que nomearam de *GmbZIP1*. Análises funcionais mostraram que plantas de *Arabidopsis* super-expressando *GmbZIP1* ativaram o fechamento estomático e diminuíram a perda de água não somente sob estresse hídrico mas também sob condições de estresse com ABA e sal. Filogeneticamente, *GmbZIP1* é um ortólogo muito próximo de *AtAREB1/AtABF2* (Figura 7a).

Fig. 7 – Árvore filogenética de *GmbZIP1* e outros fatores bZIPs divididos em seus respectivos grupos (Gao et al., 2011).



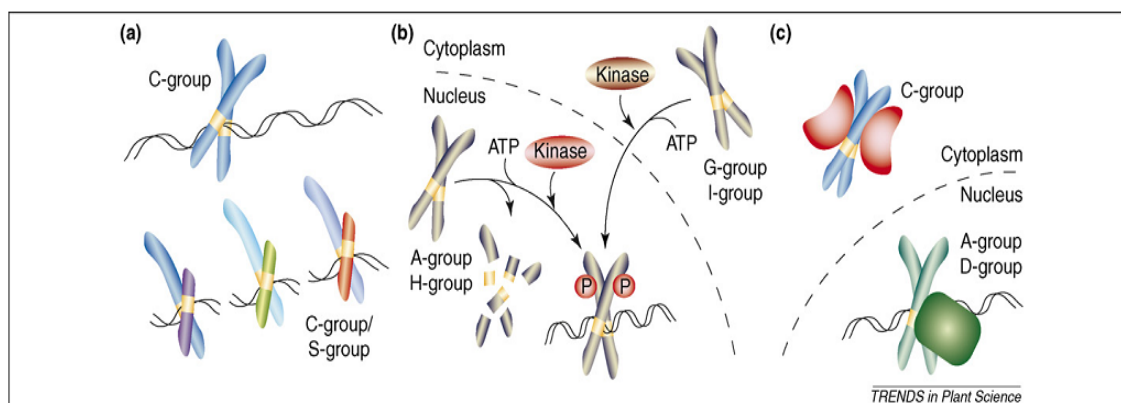
2.4.2 Dimerizações e Modificações Pós-Traducionais das Proteínas bZIPs

Ensaio de Fluorescência Bimolecular Complementar (BiFC) mostraram que os genes *AREB1*, *AREB2* e *ABF3* (todos bZIPs do grupo A) são expressos no núcleo, onde seus produtos formam homo- ou heterodímeros entre si (Yoshida et al., 2010), para então interagirem com os elementos ABREs presentes nos promotores dos genes ABA-responsivos (Figura 6). Contudo, antes desse processo os fatores bZIPs devem sofrer modificações pós-traducionais, muito importantes no controle da expressão gênica em eucariotos (Schütze et al., 2008), através da ação de proteínas quinases.

Inicialmente acreditava-se que os fatores bZIPs em *Arabidopsis* formariam preferencialmente homodímeros ou quasi-homodímeros (dímero entre 2 parálogos) (Figura 8a), mas estudos experimentais apontaram claramente para um sistema muito mais complexo de dimerização entre bZIPs, incluindo a formação de heterodímeros não previstos (Deppmann et al., 2006; Schütze et al., 2008), gerando uma grande variedade de complexos de fatores de transcrição e aumentando suas propriedades regulatórias dentro do núcleo (Figuras 8b,c).

Análises mutacionais nos sítios alvos putativos de fosforilação revelaram que o fator *AREB1* é fosforilado em múltiplos sítios e que essa modificação é indispensável para sua ativação pelo ABA (Furuhata et al., 2006). Neste trabalho, os autores demonstraram o papel funcional da fosforilação de bZIPs analisando linhagens transgênicas de *Arabidopsis* expressando uma forma fosforilada ativa de *AREB1*, *AREB1M8*, com cinco substituições de Serina/Treonina (Ser/Thr) por Aspartato (Asp). O aspartato mimetiza a carga negativa dos resíduos fosforilados e pode induzir mudanças conformacionais alostéricas na proteína e alterar sua força de repulsão e atração (Schütze et al., 2008). A fosforilação modula dessa forma a atividade do fator de transcrição em diferentes níveis, inclusive a regulação no particionamento intracelular (Figura 8b).

Fig. 8 – Mecanismos gerais da regulação pós-traducional dos principais grupos estudados de fatores de transcrição bZIPs em *Arabidopsis* (A, C, D, G, H, I e S).



a) Homodímeros e heterodímeros dos grupos C e S, por exemplo, geram uma grande variedade de fatores de transcrição. **b)** Fosforilações: o estado fosforilado regula a atividade transcritora e estabilidade dos fatores dos grupos A e H dentro do núcleo, enquanto que os grupos G e I são conhecidos por dependerem da fosforilação para serem translocados ao núcleo. **c)** Interações com outras proteínas: os grupos C, D e A podem formar complexos regulatórios específicos com proteínas não-bZIP no citoplasma ou no núcleo (Schütze et al., 2008).

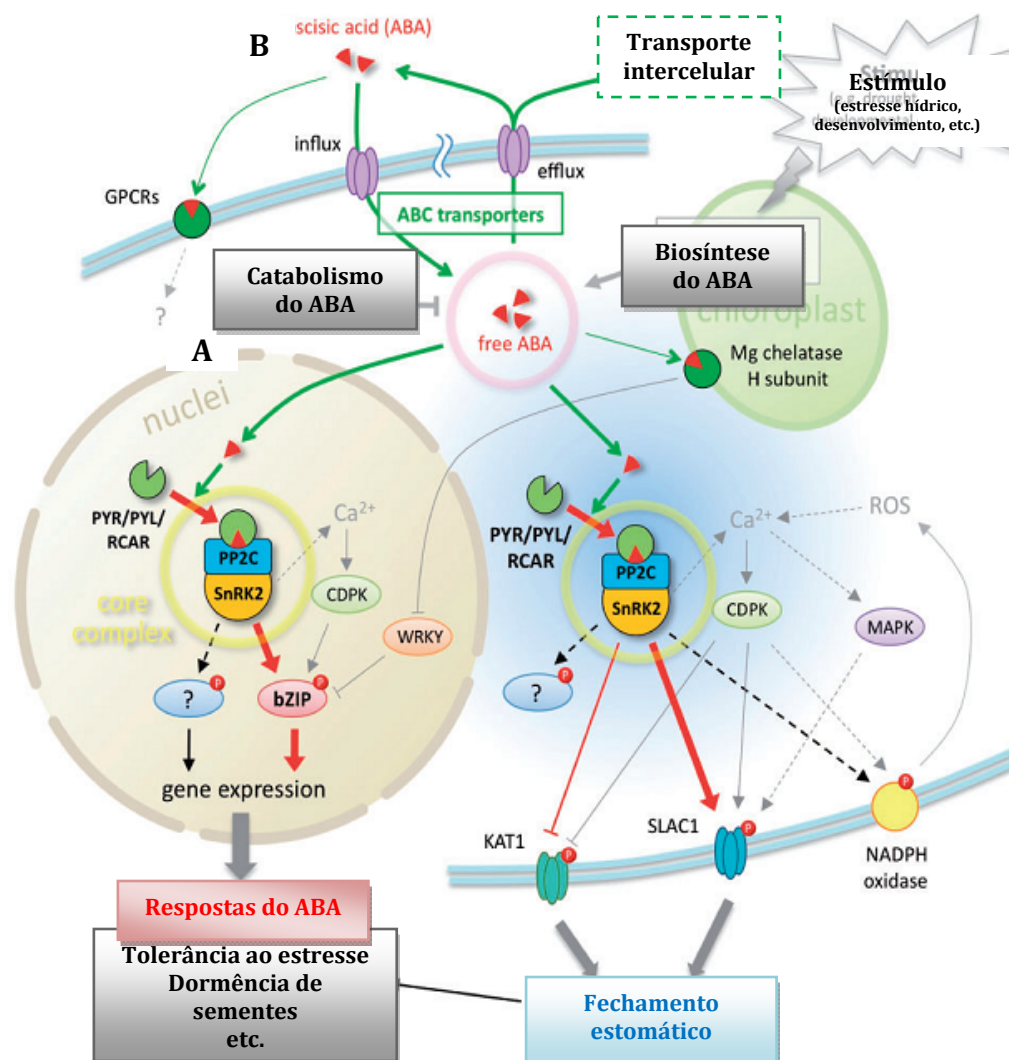
Resultados recentes sugerem ainda que os fatores bZIPs em plantas estão sob controle de vários sinais induzidos parcialmente por estresses bióticos, abióticos e de mecanismos pós-traducionais reversíveis que são cruciais para o controle de suas funções (Schütze et al., 2008). Embora se tenha conhecimento desse controle pós-traducional (possivelmente até co-traducional) em fatores bZIPs, ainda é cedo para dizer até que ponto essas mudanças podem modular a expressão dos fatores de transcrição, visto que somente alguns poucos fatores bZIPs de plantas foram analisados.

2.4.3 Complexo de Sinalização do ABA e a Cascata ABA-Dependente de AREB1

O complexo PYR/PYL/RCAR–PP2C–SnRK2 formado pelo ABA (Figura 9) foi demonstrado em ensaios de expressão transiente em mesófilos de *Arabidopsis* por Fujii e colaboradores (2009a). Apesar de bastante simples, o complexo de sinalização do ABA é sofisticado e deve variar bastante em diferentes células vegetais. Por exemplo, no genoma de *Arabidopsis* existem 14 PYR/PYL/RCARs, 9 PP2Cs e 3 SnRK2 essenciais, com potencial de muitas outras combinações entre si, sem contar os fatores AREBs, aumentando as possibilidades nas regulações transcricionais. Porém, essas variações estão limitadas pelas

determinantes bioquímicas e espaço-temporal das moléculas (Umezawa et al., 2010).

Fig. 9 – Visão geral da sensibilidade, sinalização e transporte do ABA.



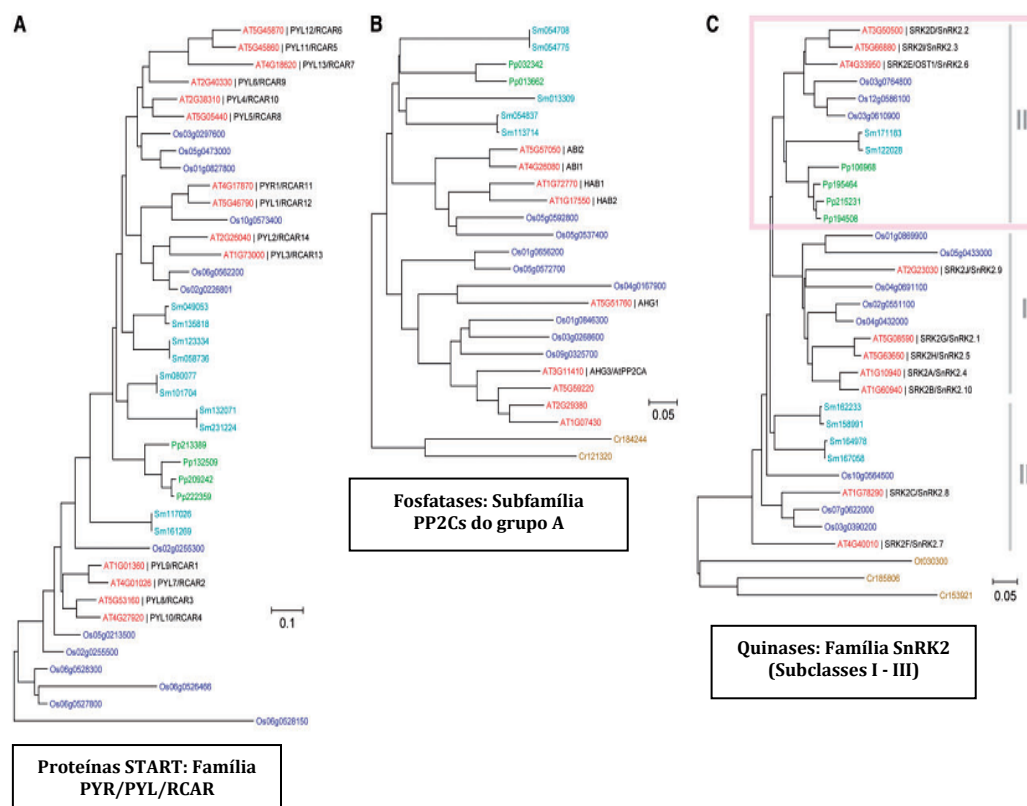
a) PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 formam o complexo de sinalização principal (círculo amarelo), que é ativado em pelo menos em dois pontos. Em um dos pontos de ativação, no núcleo, o complexo regula diretamente a expressão gênica ABA-responsiva fosforilando os fatores de transcrição AREB/ABF. No outro ponto de ativação, no citoplasma, o complexo de sinalização pode acessar a membrana plasmática e fosforilar canais de ânions (SLAC1) ou canais de potássio (KAT1) induzindo o fechamento estomático em resposta ao ABA. Outros substratos de SnRK2s ainda precisam ser identificados. **b)** o sistema de transporte do ABA consiste de 2 tipos de transportadores ABC, de influxo ou de efluxo. O movimento do ABA está indicado por linhas verdes e flechas, e as principais vias de sinalização estão indicados por linhas vermelhas e flechas. Linhas pontilhadas indicam conexões indiretas ou não confirmadas. Adaptado de Umezawa et al. (2010).

Os reguladores transcricionais da expressão gênica ABA-dependente são os AREBs/ABFs, que por sua vez são regulados positivamente pelas quinases SnRK2s e algumas outras proteínas dependentes de cálcio (SnRK3s/CIPKs e CDPKs/CPKs). Os fatores AREBs são de fato potenciais

conectores de uma rede de sinalização onde múltiplas vias que podem convergir (Halford; Hey, 2009). A ativação da SnRK é promovida pela inativação ABA-mediada das fosfatases PP2Cs, que regula negativamente as proteínas quinases (Raghavendra et al., 2010). Da mesma forma, o papel crucial das proteínas START é inibir de forma ABA-dependente a atividade das fosfatases (Ma et al., 2009; Park et al., 2008).

As proteínas fosfatases são divididas de acordo com sua especificidade no substrato em classes de Ser/Thr, Tyr e de dupla especificidade. Dependendo de suas características estruturais e bioquímicas, as fosfatases Ser/Thr de plantas são ainda divididas nos grupos PP1, PP2A e PP2C (Ma et al., 2009). As PP2Cs do grupo A (Figura 10b), mais estudadas na sinalização do ABA, são geralmente descritas como enzimas monoméricas Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependente e a inibição de sua função é orquestrada pela família de receptores PYR/PYL/RCAR (Figura 10a) que conecta a percepção do ABA diretamente ao sistema de aprisionamento (*gate-latch-lock mechanism*) das PP2Cs (Ma et al. 2009; Melcher et al., 2009; Park et al., 2009; Santiago et al., 2009). Alguns de seus principais alvos foram identificados e comprovou-se que o papel crítico dessas fosfatases é a desfosforilação e inativação das quinases SnRKs, agindo como um eixo que conecta a percepção do ABA com o controle de diferentes efetores envolvidos na tolerância ao estresse (Cutler et al., 2010).

Fig. 10 – Árvore filogenética dos componentes principais na sinalização ABA-dependente.



a) Família das proteínas START PYR/PYL/RCAR. **b)** Subfamília do grupo A das fosfatases do tipo PP2Cs. **c)** Subclasses I, II e III da família SnRK2 de quinases. As sequências de aminoácidos de cada família foi retirada de *Arabidopsis* (vermelho), arroz (azul), *Selaginella moellendorffii* (azul claro), *Physcomitrella patens* (verde), *Ostreococcus tauri* e *Chlamydomonas reinhardtii* (amarelo cada uma) usando o banco de dados SALAD. Adaptado de Umezawa et al. (2010).

As SnRK2s são alvos diretos das PP2Cs, sendo que a SRK2D/SnRK2.2 da subclasse III (Figura 10c) interage diretamente com AREB1, sendo um fator determinante na sensibilidade do ABA (Fujita et al., 2009; Yoshida et al., 2010), talvez por ser mais abundante que SRK2I/SnRK2.3 e SRK2E/SnRK2.6 (Fujii et al., 2007). SnRK2s são uma família de proteínas quinases planta-específico contendo 10 membros (SnRK2.1–2.10) em *Arabidopsis*, e 10 (SAPK1–10) em *Oryza sativa* (Hrabak et al., 2003). Foi demonstrado que SRK2D, SRK2I, SRK2E e SRK2C/SnRK2.8 foram todas capazes de fosforilar AREB1/ABF2 (Furihata et al., 2006). Foi observado também que tanto em triplo mutantes nocauteados *srk2d srk2e srk2i* (Fujita et al., 2009) como em mutantes *areb1 areb2 abf3* (Yoshida et al., 2010), a expressão de genes ABA-responsivos como proteínas LEA e PP2Cs grupo A foi significativamente reduzida em comparação com as plantas selvagens, sob estresse hídrico.

No caso das SnRK2s, além da alta redundância entre suas funções, observou-se também que nas linhagens de *Arabidopsis* carregando mutações nas 10 quinases, o décuplo mutante *snrk2.1/2/3/4/5/6/7/8/9/10*, houveram respostas residuais mínimas, indicando que alguma sinalização sob estresse osmótico está presente. É possível que as CDPKs e SnRK3s envolvidas na resposta ao estresse salino tenham substratos em comum com as SnRK2s, ocasionando essa resposta residual, insuficiente no entanto, para recuperar o desenvolvimento comprometido no décuplo mutante (Fujii et al., 2011). Muitos alvos de SnRK2 foram identificados tanto na membrana plasmática quanto dentro do núcleo (Figura 9a), resultando no controle de canais de íons, produção de mensageiros secundários e expressão de genes ABA-responsivos (Raghavendra et al., 2010), mas não se sabe se sua autofosforilação é suficiente para ativá-la ou se ainda outros fatores *in vivo* são necessários (Cutler et al., 2010). Tais fatores (possivelmente CDPKs?) poderiam adicionar uma regulação positiva que age em sentido contrário à regulação negativa exercida pelas PP2Cs sobre as SnRK2s (Boudsocq et al., 2007).

Para verificar as funções sobrepostas dos fatores AREBs foram feitas análises em larga escala do transcriptoma do triplo mutante *areb1*, *areb2* e *abf3*, e alguns genes significativamente *down* regulados foram identificados em resposta à desidratação, à alta salinidade e ao tratamento com ABA, incluindo genes da classe das proteínas LEA como *RD29B*, *AIL1*, *RAB18*, *EM1* e *EM6*; genes ABA-regulados como *RD20*, *LTP4* e *SAG29*; genes de fatores de transcrição MYB como *AtMYB74*, *AtMYB79*, *AtMYB102* e *AtMYB121*; e genes das fosfatases grupo-A tipo 2 como *AHG1*, *AHG3*, *HAI1*, *HAI2* e *HAI3* (Yoshida et al., 2010).

Muitas respostas na via do complexo de sinalização do ABA ainda são desconhecidas. A visão geral dessa via esquematizada na figura 9 serve como um guia de posicionamento e hierarquias para entender a relevância de cada fator. Por exemplo, o fator de transcrição ABO3 (família WRKY) parece ter um papel importante nas respostas vegetais ao ABA e ao estresse hídrico, pois em um estudo *in vitro* este fator foi capaz de se ligar à caixa W também presente no promotor de *AREB1/ABF2* (Ren et al., 2010). Porém esse fator tem a princípio um papel secundário na ativação da expressão gênica de *AtAREB1*. Além de sua importância na resposta ao estresse, como já citado anteriormente, o ABA participa no crescimento e desenvolvimento da planta, e a ativação constitutiva dessa via pode

resultar em problemas no crescimento. Assim, é necessário um “ajuste-fino” da cascata (por exemplo, repressão da via) para evitar que uma resposta constitutiva ao ABA endógeno possa ser deletéria para o crescimento da planta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Introduzir a construção gênica *pBI35S Ω -AtAREB1 (35S:AREB1)* em embriões de soja e caracterizar molecularmente as linhagens obtidas, selecionando assim eventos candidatos para o avanço de gerações, futuras análises agronômicas, fisiológicas e caracterização do perfil de expressão gênica das redes regulatórias que o transgene pode modular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter via biobalística, o mínimo de três eventos de soja GMs positivos e independentes para a construção gênica *35S:AREB1*;
2. Caracterizar molecularmente os eventos obtidos quanto ao número de cópias do transgene;
3. Caracterizar a expressão relativa e constitutiva de *AtAREB1* nos eventos obtidos sem indução de déficit hídrico;
4. Analisar a segregação e herança dos transgenes;
5. Selecionar entre os eventos caracterizados os melhores candidatos para futuros experimentos com indução de estresse em câmara de crescimento e casa de vegetação abordando parâmetros de germinação, crescimento e tolerância aos estresses hídrico e de aplicação de ABA.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K. et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v.15, p.305-327, 2005.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v.431, p.356-363, 2004.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reporter**, v.27, p. 411–424, 2008.
- BREITLER, J. C.; LABEYRIE, A.; MEYNARD, D.; LEGAVRE, T.; GUIDERDONI, E. Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. **Theoretical Applied Genetics**, v.104, p.709-719, 2002.
- BOUDSOCQ, M.; DROILLARD, M-J.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIÈRE, C. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v.63, p.491-503, 2007.
- BURKE, E. J.; BROWN, S. J.; CHRISTIDIS, N. Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley centre climate model. **Journal Hydrometeorology**, v.7, p.1113-1125, 2006.
- CASARETTO, J.; HO, T-HD. The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. **Plant Cell**, v.15, p.271-284, 2003.
- CHAMEIDES, W. L.; KASIBHATLA, P. S.; YIENGER, J.; LEVY II, H. Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. **Science**, v.264, p.74-77, 1994.
- CHINNUSAMY, V; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.395, p.225-236, 2004.
- CHOI, H.; HONG, J.; HA, J.; KANG, J.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **Journal Biological Chemistry**, v.275, p.1723-1730, 2000.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 15 Julho 2011; 09 de Janeiro de 2012.
- CORRÊA, L. G.; RIANO-PACHON, D. M.; SCHRAGO, C. G.; DOS SANTOS, R. V.; MUELLER-ROEBER, B.; VINCENTZ, M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PLoS One**, v.3, n.8, 2008.
- CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2012.

CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, 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.

DEPPMANN, C. D.; ALVANIA, R. S.; TAPAROWSKY, E. J. Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed interaction networks. **Molecular Biology Evolution**, v.23, p.1480-1492, 2006.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Integrated bombardment & *Agrobacterium* system: an alternative method for soybean transformation. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.18, n.1, p.1-10, 2000.

FAGARD, M. & VAUCHERET, H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.167-174, 2000.

FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.387-415, 2008.

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

_____; CHINNUSAMY, V., RODRIGUES, A.; RUBIO, S.; ANTONI, R.; PARK, S.-Y.; CUTLER, S. R.; SHEEN, J.; RODRIGUEZ, P. L.; ZHU, J.-K. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. **Nature**, v.462, p.660-664, 2009.

_____; VERSLUES, P. E.; ZHU, J.-K. *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.4, p.1717-1722, 2011.

FUHRER, J. Ozone risk for crops and pastures in present and future climates. **Naturwissenschaften**, v.96, p.173-194, 2009.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. 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.

_____; NAKASHIMA, K.; YOSHIDA, T.; KATAGIRI, T.; KIDOKORO, S.; KANAMORI, N.; UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; KOBAYASHI, M.; NAKASONE, S.; YAMADA, K.; ITO, T.; HINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiology**, v.50, p.2123-2132, 2009.

_____; 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, Y.; FUJITA, Y.; UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.6, p.1988-1993, 2006.

GAO, S. Q.; CHEN, M.; XU, Z. S.; ZHAO, C. P.; LI, L.; XU, H. J.; TANG, Y. M.; ZHAO, X.; MA, Y. Z. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.75, n.6, p.537-53, 2011.

GOMEZ-PORRAS, J.; RIAN, O.; PACHO, N. D.; DREYER, I.; MAYER, J.; MUELLER-ROEBER, B. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in *Arabidopsis* and rice. **BMC Genomics**, v.8, p.260, 2007.

GUILTINAN, M. J.; MARCOTTE, W. R.; QUATRANO, R. S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. **Science**, v.250, p.267–271, 1990.

HALFORD, N. G.; HEY, S. J. SNF1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. **Biochemical Journal**, v.419, p.247-259, 2009.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. **Science**, v.286, p.950-952, 1999.

HEATHERLY, L. G. & ELMORE, R. W. Managing inputs for peak production. **In Soybeans: Improvement, Production and Uses**. Edited by Specht, J. E. & Boerma, H. R. p.451-536. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 2004.

HINCHEE, M.A.W. et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Biotechnology**, v.6, p.915-922, 1988.

HOBO, T.; KOWYAMA, Y.; HATTORI, T. A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid induced transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.15348–15353, 1999.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.7276-7280, 1991.

HRABAK, E. M.; CHAN, C. W. M.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; CHOI, J. H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H. G.; SUSSMAN, M. R.; THOMAS, M.; WALKER-SIMMONS, K.; ZHU, J-K; HARMON, A. C. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. **Plant Physiology**, v.132, p.666-680, 2003.

HSIEH, T. H.; LI, C. W.; SU, R. C.; CHENG, C. P.; SANJAYA, T.; CHAN, M. T. A tomato bZIP transcription factor, SIAREB, is involved in water deficit and salt stress response. **Planta**, v.231, n.6, p.1459-1473, 2010.

HUSSAIN, S. S.; KAYANI, M. A.; AMJAD, M. Transcription Factors as Tools to Engineer Enhanced Drought Stress Tolerance in Plants. **Biotechnology Progress**, v.27, n.2, 2011.

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.

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DROEGE-LASER, W.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; TIEDEMANN, J.; KROJ, T.; PARCY, F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v.7, p.106-111, 2002.

JINEK, M. & DOUDNA, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v.457, 2009.

JOHNSON, R. R.; WAGNER, R. L.; VERHEY, S. D.; WALKER-SIMMONS, M. K. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. **Plant Physiology**, v.130, p.837-846, 2002.

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. Y.; CHUNG, H. J.; THOMAS, T. L. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. **The Plant Journal**, v.11, p.1237-1251, 1997.

_____; KANG, J. Y.; CHO, D. I.; PARK, J. H.; KIM, S. Y. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. **The Plant Journal**, v.40, p.75-87, 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 Ca²⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.561-591, 2010.

KOOTER, J. M.; MATZKE, M. A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, v.4, p.340-436, 1999.

LEE, S. J.; KANG, J. Y.; PARK, H. J.; KIM, M. D.; BAE, M. S.; CHOI, H. I.; KIM, S. Y. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. **Plant Physiology**, v.153, p.716-727, 2010.

LIAO, Y.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y.; ZHANG, W. K. Role of GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, p.221-230, 2008a.

_____; ZOU, H. F.; WEI, W.; HAO, Y. J.; TIAN, A. G.; HUANG, J. et al. Soybean GmbZIP144, GmbZIP162 and GmbZIP178 genes function as negative regulator of

ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Planta**, v.228, p.225-240, 2008b.

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

LOC, N. T.; TINJUANGJUN, P.; GATEHOUSE, A. M. R.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, J. A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. **Molecular Breeding**, v.9, p.231-244, 2002.

LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; LEAKEY, A. D. B.; NÖSBERGER, J.; ORT, D. R. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. **Science**, v.312, p.1918-1921, 2006.

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.

MCCABE, D. E.; SWAIN, W. F.; MARTINELL, B. J.; CHRISTOU, P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. **Biotechnology**, v.6, p.923-926, 1988.

MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L. S.; NGUYEN, H. T. 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. Exportações do agronegócio atingem valor previsto para 2011. Disponível no site <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 15 de Outubro de 2011.

MARCELINO, F. C. **Avaliação de resíduos transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 132p. Tese (Universidade Federal de Viçosa/MG), p.132, 2006.

MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, C. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v.174, p.420-431, 2008.

MELCHER, K.; NG, L. M.; ZHOU, X. E.; SOON, F. F.; XU, Y.; SUINO-POWELL, K. M.; PARK, S. Y.; WEINER, J. J.; FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; KOVACH, A.; LI, J.; WANG, Y.; LI, J.; PETERSON, F. C.; JENSEN, D. R.; YONG, E. L.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R.; ZHU, J. K.; XU, H. E. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. **Nature**, v.462, p.602-608, 2009.

MITRA, J. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, v.80, n.6, 2001.

- MIYAZONO, K.; MIYAKAWA, T.; SAWANO, Y.; KUBOTA, K.; KANG, H. J.; ASANO, A.; MIYAUCHI, Y.; TAKAHASHI, M.; ZHI, Y.; FUJITA, Y. et al. Structural basis of abscisic acid signalling. **Nature**, v.462, p.609-614, 2009.
- NAKASHIMA, K.; ITO, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant Physiology**, v.149, n.1, p.88-95, 2009.
- NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **The Plant Journal**, v.34, p.137-148, 2003.
- NG, H-H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Current Opinion in Genetic and Development**, v.9, p.158-163, 1999.
- 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.
- NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; ARVAI, A. S.; RAMBO, R. P.; HITOMI, C.; CUTLER, S. R.; SCHROEDER, J. I.; GETZOFF, E. D. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. **Science**, v.326, p.1373-1379, 2009.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.33, p.10-13, 2004.
- NOVÁKOVÁ, M.; MOTYKA, V.; DOBREV, P. I.; MALBECK, J.; GAUDINOVÁ, A.; VANKOVÁ, R. Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.2877-2883, 2005.
- OSOSKI, A. L. & KENNELLY, E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research**, v.17, p.84-86, 2003.
- PARK, S. Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D. R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T. F. et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, v.324, p.1068-1071, 2009.
- PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular Biotechnology**, v.6, p.17-30, 1996.
- PETHERICK, A. High hopes for Brazilian science. Published online 9 June 2010. **Nature**, v.465, p.674-675, 2010.
- PIMENTEL, D. & PATZEK, T. Ethanol production using corn, switchgrass and wood; biodiesel production using soybean. **In Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems**. Edited by Pimentel, D. p.373-394, Springer, New York, 2008.

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono de plantas cultivadas e o aumento de CO₂ e de O₃ atmosférico: situação e previsões. **Bragantia**, v.70, n.1, p.1-12, 2011.

RAGHAVENDRA, A. S.; GONUGUNTA, V. K.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. ABA perception and signalling. **Trends in Plant Science**, v.15, p.395-401, 2010.

REEDY, M. S. S.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Reporter**, v.21, p.676-683, 2003.

REN, X.; CHEN, Z.; LIU, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, M., LIU, Q.; HONG, X.; ZHU, J-K.; GONG, Z. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.63, p.417-429, 2010.

ROMANO, A.; RAEMAKERS, K.; BERNARDI, J.; VISSER, R.; MOOIBROEK, H. Transgene organization in potato after particle bombardment-mediated (co)transformation using plasmids and gene cassettes. **Transgenic Research**, v.12, p.461-473, 2003.

_____; VAN DER PLAS, L. H. W.; WITHOLT, B.; EGGINK, G., MOOIBROEK, H. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, v.220, p.45-464, 2005.

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

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology**, v.5, p.27-37, 1987.

SANTIAGO, J.; DUPEUX, F.; ROUND, A.; ANTONI, R.; PARK, S. Y.; JAMIN, M.; CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; MÁRQUEZ, J. A. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature**, v.462, p.665-668, 2009.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA Microarray. **Plant Cell**, v.13, p.61-72, 2002.

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

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v.463, p.178-83, 2010.

SCHÜTZE, K.; HARTER, K.; CHABAN, C. Post-translational regulation of plant bZIP factors. **Trends in Plant Science**; v.13, p.247-255, 2008.

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

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

_____; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, p.221-227, 2007.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.503-517, 1975.

TRAN, L-S; NISHIYAMA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. **GM crops**, v.1, n.1, p.32-38, 2010.

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.193-123, 2001.

UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F. et al. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17588–17593, 2009.

_____; 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 and Cell Physiology**, v.51, p.1821-1839, 2010.

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

VLAD, F.; RUBIO, S.; RODRIGUES, A.; SIRICHANDRA, C.; BELIN, C. et al. Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.21, p.3170-3184, 2009.

WALLRATH, L. L. Unfolding the mysteries of heterochromatin. **Current Opinion in Genetic and Development**, v.8, p.147-15, 1998.

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.203-220, 2000.

WATERHOUSE, P.M. & HELLIWELL, C. A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetic**, v.4, p.29-38, 2003.

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

YIN, P.; FAN, H.; HAO, Q.; YUAN, X.; WU, D.; PANG, Y.; YAN, C.; LI, W.; WANG, J.; YAN, N. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. **Natural Structural and Molecular Biology**, v.16, p.1230-1236, 2009.

YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; SAYAMA, H.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; 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.

YUAN, J. S.; BURRIS, J.; STEWART, N. R.; MENTEWAB, A.; STEWART, N. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Informatics**, v.8, 2007.

ZAMORE, P. D. RNA interference: listening to the sound of silence. **Natural Structural and Molecular Biology**, v.8, p.746-750, 2001.

ZHANG, W.; RUAN, J.; HO, T-D.; YOU, Y.; YU, T.; QUATRANO, R. S. *Cis* regulatory element based targeted gene finding: Genome wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.21, p.3074-3081, 2005.

CAPÍTULO 2

5 ARTIGO: OBTENÇÃO, SELEÇÃO DE EVENTOS DE SOJA CONTENDO O GENE *ATAREB1* E ANÁLISES DA SINALIZAÇÃO ABA-DEPENDENTE

Artigo a ser submetido à revista *Plant Molecular Biology Reporter*

5.1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos fatores que afetam a agricultura mundialmente, a seca é o estresse ambiental mais importante (Yang et al., 2010). Para a cultura da soja, espécie de destaque no agronegócio, o déficit hídrico leva a perdas de produtividade que comprometem a estocagem e produção de alimentos tanto para humanos quanto para animais, a produção do biodiesel, dentre outras demandas ao longo de sua extensa cadeia produtiva. Explorar as redes regulatórias e os genes que participam nos mecanismos de tolerância e defesa presentes nos vegetais tem se mostrado uma tarefa necessária e urgente em razão principalmente de inúmeras previsões preocupantes para o crescimento populacional e diminuição da área plantada, à curto e médio prazo, devido às mudanças climáticas globais (Jaggard et al., 2010). Dentro das vias de sinalização estresse-induzidas, a via Ácido Abscísico (ABA)-dependente se ramifica por um sistema bem complexo de interações moleculares através do envolvimento de vários Fatores de Transcrição (FT). Um desses fatores dependentes de ABA é a proteína *AREB1*, isolada de *Arabidopsis thaliana* (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000; Fujita et al., 2005). Esta molécula chave modula genes *up-* e *downstream* presentes nessa cascata de defesa abiótica. Plantas super-expressando FTs como DREB, NAC, MYB, WRKY entre outros genes de tolerância à estresses abióticos foram geradas e seus efeitos foram caracterizados em diversas culturas como arroz, trigo, tabaco e *Arabidopsis* (Hussain et al., 2010), porém, em soja esses trabalhos são mais recentes (Tran et al., 2009; Hao et al., 2011; Polizel et al., 2011). Alguns estudos já geraram plantas de soja com genes de defesa à herbicidas/agrotóxicos ou resistência à insetos (CTNBio, 2012), por transformação via biobalística, uma metodologia simples, eficaz

e aplicável para esta cultura. A estratégia do uso de FTs é conhecida como a terceira geração de Plantas Geneticamente Modificadas (PGMs), fruto de uma bioengenharia que regula vários genes ao mesmo tempo. Esses estudos tem direcionado esforços na obtenção de plantas que toleram 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 através de genes que auxiliam a planta a administrar o uso da água e direcionar suas energias de forma sistêmica sob condições ambientais de seca. Recentemente surgiram ferramentas para a análise do fosfoproteoma e interactoma dessas espécies (Umezawa et al., 2011), contribuindo ainda mais para a completa caracterização da estrutura e dinâmica dessas rotas metabólicas sinalizadas via ABA. Embora atualmente estas técnicas de ponta forneçam informações a nível de proteoma e de interações de vias metabólicas, a pesquisa básica é e será sempre foco dos cientistas, pois compreender as complexas redes de respostas estresse-induzido é fundamental no delineamento de estratégias para obtenção de cultivares mais tolerantes à seca.

Neste contexto científico, que busca a geração de plantas mais tolerantes a estresses ambientais, Fujita e colaboradores (2005) constataram a indução do gene *AtAREB1* em *Arabidopsis* sob déficit hídrico e outros estresses abióticos, considerando o gene como um recurso genético interessante para espécies tolerantes à diversos estresses. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar molecularmente linhagens contendo a construção gênica *35S:AREB1* em embriões de soja da cultivar BR16, sensível ao déficit hídrico, para posteriormente analisá-las quanto aos genes envolvidos na cascata ABA-independente. Após a obtenção dos eventos positivos para o transgene, estes foram caracterizados quanto à expressão do gene, ao número de cópias inseridas e à transmissão e segregação do transgene nas gerações seguintes.

Abstract: Currently, the development of genetically modified plants (GMPs) is focused on the introduction of transcription factors (TFs) that controls numerous stress-inducible genes. The *AREB1* gene is a TF with bZIP domain and is related to the ABA-dependent pathway under water stress. The objective of the present study was to obtain soybean plants genetically modified with the *pBI35S Ω :AtAREB1* (*35S:AREB1*) genetic construction and characterize these events using Southern blot and RT-qPCR regarding to copy number and transgene relative expression under control conditions, besides segregation study on T₁ generation. Based on the results

obtained, three candidate events were chosen to be used in further studies on water deficit tolerance in greenhouse conditions. This is the first study reporting the use of this genetic construction in soybean. Transformation efficiency was 0,75% (12 positive events/1.583 transformed embryos). From a total of eight positive and non-chimeric events, three best candidate events were chosen, A24, A2889 and A2057 with one or two, three and above ten copies, respectively, and showing different transgene relative expression. Additionally, a derivation of the formula normally used to quantify number of inserted copies using RT-qPCR was used, in which the use of a previously known calibrator sample is discarded. Instead, an endogenous reference gene was used as the calibrator through the formula $2^{-\Delta Ct}$. Results from Southern blot and RT-qPCR techniques were consistent when compared. Thus, the introduction of *pBI35S Ω :AtAREB1* in soybean via biolistic generated stable events containing few copies of the transgene. These results are important not only on the understanding of the ABA-dependent signalling pathway but also on the development of short-term efficient and systemic strategies to obtain soybean plants tolerant to drought.

Keywords: Water deficit. *AREB1*, ABA-dependent. *Glycine max*

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do Cassete de Expressão

O cassete de expressão *pBI35S Ω :AtAREB1* ou *35S:AREB1* foi construído no Centro Internacional Japonês de Pesquisa de Ciências Agrícolas (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences - JIRCAS*), e enviado para a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) através de um Acordo de Transferência de Materiais (MTA), sob a patente 2009/0089899. Nesta construção, foi utilizado o plasmídeo pBI221 (Chen et al., 2003; Fujita et al., 2005), onde o promotor constitutivo *CaMV 35S* isolado do *Cauliflower mosaic virus* (Benfey; Chua, 1990) mais o *enhancer* Ω foram ligados ao cDNA do gene *AREB1* de *Arabidopsis thaliana*, juntamente com o terminador *Tnos* (Nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*), sítio de poliadenilação que sinaliza o fim da transcrição. O plasmídeo foi inserido em *Escherichia coli* (linhagem DH5 α) segundo o protocolo de Miller e Nickoloff (1995), e o DNA plasmidial extraído utilizando o *kit Purelink High Pure Maxiprep Invitrogen*, conforme instruções do fabricante.

A confirmação do tamanho dos fragmentos no cassete de expressão foi realizada através de duas reações de digestão com distintas enzimas de restrição. Em uma primeira reação, 100 ng do DNA plasmidial foi digerido com 5U da enzima *NotI* e 5U da enzima *EcoRI* a 37°C por 3h, seguido de 10 min a 65°C. Em

outra reação de digestão, 100 ng do DNA plasmidial foi digerido com 5U da enzima *Sma*I a 30°C por 3h, seguido de 10 min a 65°C. Os fragmentos obtidos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,3 %).

5.2.2 Co-transformação Via Biobalística com a Construção Gênica 35S:AREB1

A etapa de regeneração de plantas férteis pós-transformação é a de mais difícil otimização e sucesso no processo de transformação genética, e por esta razão, utilizamos neste trabalho alguns métodos para melhorar a eficiência da regeneração, seguindo o protocolo descrito por Rech et al. (2008). A abordagem utilizada para melhorar a recuperação da plantas consistiu na introdução de um gene marcador de seleção (*ahas*) via co-transformação por biobalística nos embriões de soja da cultivar sensível à seca BR16 (Oya et al., 2004) transformados e posterior indução de multibrotamento dos eixos embrionários bombardeados pela ação do hormônio de crescimento citocinina-6-benzilaminopurina (BAP). O gene *ahas* de *A. thaliana* contém uma mutação na posição 653, que resulta em uma substituição dos aminoácidos serina por asparagina. Esta mudança confere resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas, moléculas que inibem a atividade enzimática da sintase acetohidroxiácida, enzima que catalisa o passo inicial na biossíntese de isoleucina, leucina e valina, aminoácidos essenciais para a planta (Aragão et al., 2000; Aragão et al., 2002). Quando colocados no meio de seleção com o herbicida da classe das imidazolinonas (imazapir), capaz de se translocar e se concentrar na região meristemática apical dos embriões co-transformados, estes estarão aptos a sintetizar a enzima sintase acetohidroxiácida pela resistência adquirida quando da introdução do gene *ahas*. Por fim, neste protocolo a indução de multibrotamento pelo BAP torna-o muito eficaz na recuperação dos eixos embrionários transformados.

Inicialmente, foi feita a assepsia das sementes de soja através da esterilização com etanol 70% por 10 min, seguido de imersão por 20 min em solução de hipoclorito de sódio a 50%, e posterior lavagens com água destilada. Por fim, as sementes foram imersas em água para hidratação por aproximadamente 16h. Com o auxílio de pinças e bisturis estéreis, os embriões de soja foram retirados e depositados em placas de Petri com água destilada para evitar dessecação. Os

primórdios foliares foram retirados com auxílio de um microscópio estereoscópio modelo SQZ-DS4-BI (*Tecnival*) e colocados em papel filtro para secagem, em fluxo laminar. Os DNAs exógenos utilizados no processo de co-bombardamento foram a construção gênica *35S:AREB1* e a construção *pAC321 (Ahas)* (Figuras 1 e 2, respectivamente). Para o processo de co-transformação (Rech et al., 2008), 8µg de cada um dos DNAs de interesse foram precipitados em micropartículas de tungstênio (0,5 a 5 µm) em uma reação com volume final de 200 µL, contendo 6,5% de glicerol, 20 mM de espermidina e 1,37 M de CaCl₂.

Fig. 1 – Mapa de restrição do plasmídio *pBI221* com o inserto (promotor 35S + *AREB1* + terminador NosT): *pBI35SΩ:AtAREB1* ou *35S:AREB1*.

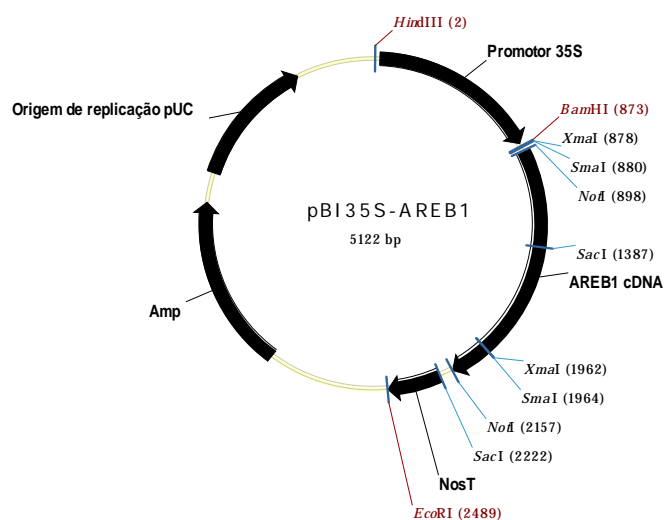
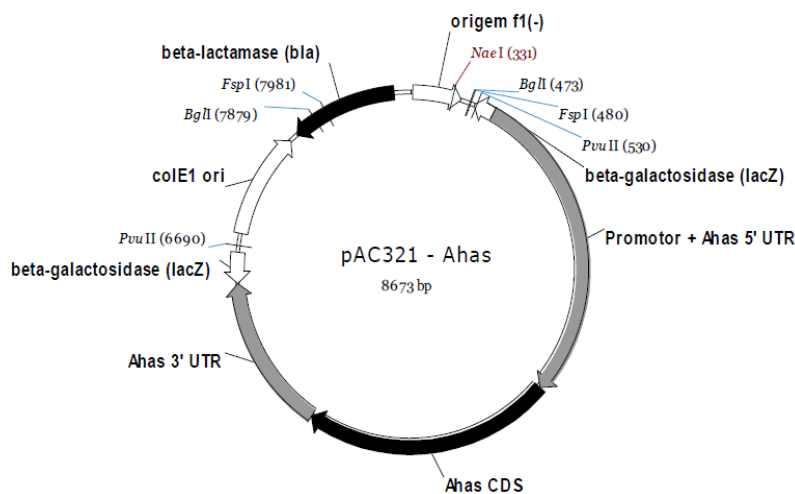


Fig. 2 – Mapa de restrição do plasmídio *pAC321* contendo a sequência do gene *Ahas* (promotor *Ahas* + *Ahas* 5' UTR + *Ahas* CDS + *Ahas* 3' UTR): *Ahas*.



Para o procedimento de bombardeamento, após a sonicação por 2 seg, alíquotas do DNA precipitado nas micropartículas foram distribuídas em membranas carreadoras de Kapton, já posicionadas no suporte de membrana. As partículas foram então aceleradas em alta velocidade, atingindo o meristema apical dos embriões de soja (Oya et al., 2004).

Após a co-transformação, os embriões foram transferidos para meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), pH 5,7 suplementado com 5 mg/mL de BAP, 3% de sacarose, 0,6% de ágar, por um período de 16h – 20h, ao abrigo da luz, a 28°C, para a indução do multibrotamento. Após este período, grupos de aproximadamente oito embriões foram transferidos para copos plástico contendo meio seletivo (MS, 3% sacarose, 0,15 µM Imazapyr, 0,8% agar, vitaminas B5 e pH 5,7), permanecendo por aproximadamente 45 dias em câmara climatizada, com 16h de fotoperíodo, luminosidade de 50 µ mol.m⁻².s⁻¹, a 25°C e a 60% de umidade. Transcorrido este período, os embriões foram transferidos para copos plásticos contendo areia:vermiculita (1:1), regados com solução nutritiva e cobertos por sacos plásticos para aclimação.

5.2.3 Identificação dos Eventos Quiméricos e Positivos

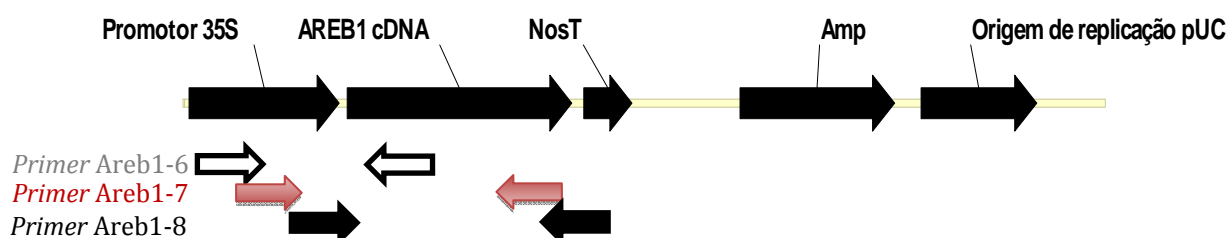
Ainda em câmara climatizada, amostras das folhas das plântulas transformadas foram coletadas e o DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1987).

A confirmação dos eventos positivos foi realizada via PCR convencional utilizando-se pares de *primers* específicos (Tabela 1) para o gene de interesse *35S:AREB1* e para o gene marcador *ahas*. Três conjuntos de *primers* diferentes foram utilizados para a identificação dos eventos positivos. O conjunto de *primers Areb1-6* se anela no início região promotora até o início da região codante, amplificando um fragmento de 904 pb; o conjunto de *primers Areb1-7* se anela no meio do promotor até o final da região codante, amplificando um fragmento de 639 pb; e o conjunto de *primers Areb1-8* se anela no final do promotor até o início da região terminadora, amplificando um fragmento de 1502 pb (Figura 3).

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR para a confirmação dos eventos quiméricos e positivos para a construção *AtAREB1*.

Primers	Sequência (5' -> 3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>AtAREB1 areb1-6</i>	F AGGTCTCATCAAGACGATCTAC R AACGAGTATATCGAACCTTGTC	904
<i>AtAREB1 areb1-7</i>	F AGAAGAAAATCTTCGTCAACAT R TAACAACCTCATCCATGTTTCATT	639
<i>AtAREB1 areb1-8</i>	F GAAGTTCATTTTCATTTGGAGAG R ACATGCTTAACGTAATTCAACA	1502
<i>ahas</i>	F ACTAGAGATTCCAGCGTCAC R GTGGCTATACAGATACCTGG	686

Fig. 3 – Esquema do plasmídeo linearizado com as regiões onde os diferentes conjuntos de *primers* se anexam para amplificação via PCR.



O uso desses três conjuntos de *primers* objetivou a identificação de eventos contendo a construção inteira (promotor + cDNA + terminador) no genoma da soja, e não somente uma parte dela, quando uma quebra do DNA exógeno poderia ocorrer durante o processo de bombardeamento da geração T_0 .

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 μ L composta de 5 μ M de cada *primer F* e *R*, 0,4mM de dNTP's, 2 mM cloreto de magnésio, 1U de *TaqDNA* polimerase e 60 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Veriti Applied Biosystems* e a ciclagem utilizada foi composta por denaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e 72°C por 7 min. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,2% e visualizados em transluminador UV.

Para a realização do teste de quimera em plantas identificadas como positivas, três ou quatro amostras de folhas, dependendo de seu estado de desenvolvimento, foram coletadas de diferentes trifólios e tiveram seu DNA genômico extraído segundo o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). A

confirmação dos eventos transgênicos foi realizada por meio de PCR convencional utilizando as diferentes amostras de DNA provenientes da mesma plântula, nas mesmas condições de reação e ciclagem utilizadas para a identificação do evento. Como padrão, foi considerado evento não quimérico, aquele em que todas as amostras de folhas testadas confirmaram presença do transgene inserido; caso contrário, se pelo menos uma das amostras de folha não apresentasse a inserção, o evento era considerado quimérico. Somente após a realização do teste de quimera, as plantas consideradas negativas para o teste, ou seja, plantas identificadas com a presença das construções gênicas inseridas, foram transferidas para a casa de vegetação para avanço de geração e multiplicação de sementes a serem utilizadas em análises futuras.

5.2.4 Quantificação Relativa do Número de Cópias do Transgene via RT-qPCR

As construções dos *primers* e da sonda para a metodologia TaqMan foram feitas utilizando os programas *Vector NTI 11*, *MEGA 4*, *ClustalX 2.1* e *CLC Sequence viewer*. Para que não ocorresse nenhuma amplificação de genes ortólogos de *AtAREB1*, foi feito um alinhamento *pairwise* de modelos gênicos de *AREB1* presentes no genoma e depositados no *site* www.phytozome.net. Depois de identificado os modelos gênicos mais similares (*Glyma02g14880*, *Glyma07g33600*, *Glyma13g22060* e *Glyma10g08370*) e também os *GmbZIPs* (previamente descritos 1, 44, 62, 78 e 132), um alinhamento múltiplo para ancorar a sequência do transgene com as sequências das possíveis regiões ortólogas foi realizado. Os *primers* e a sonda foram desenhados, excluindo as regiões em comum onde possíveis amplificações endógenas pudessem ocorrer (Tabela 2).

Nesta análise para número de cópias inseridas, o gene endógeno da lectina (*GmLec*, Acesso No. K00821) foi utilizado como gene de referência e também como calibrador, uma vez que é espécie-específico e apresenta apenas uma cópia no genoma haplóide de soja (Meyer et al., 1994), ou duas cópias alélicas (homozigoto).

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como *primers* e as sondas

<i>Primers</i>	Sequência (5' -> 3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>AtAREB1-F</i>	ACATACCAGCAATCGCAACA	67 pb
<i>AtAREB1-R</i>	CCACAAGACCACCACCTCTT	
<i>AtAREB1-S</i>	TCAACGAGTATATCGAACCTT	
<i>GmLec-F</i>	TCCCGAGTGGGTGAGGATAG	65 pb
<i>GmLec-R</i>	CATGCGATTCCCCAGGTATG	
<i>GmLec-S</i>	TCTCTGCTGCCACGGGACTCG	

Para ambos os genes (*AtAREB1* e *GmLec*) uma curva de eficiência de amplificação foi realizada utilizando-se uma série de diluições do DNA (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e 10^0). A placa do experimento foi montada em triplicata tanto para o gene alvo quanto para o endógeno, o que permitiu verificar a eficiência de amplificação dos *primers* na reação. Os parâmetros de ciclagem para as reações foram 50°C por 2 min, 95°C por 2 min seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. As reações de PCR foram realizadas em termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem, Foster, CA, USA).

5.2.5 Quantificação Relativa Utilizando a Referência Endógena como Calibrador pelo Método $2^{-\Delta Ct}$

Para a determinação do número de cópias do transgene por quantificação relativa o próprio gene de referência endógena *GmLectina* foi utilizado como calibrador. Os valores de Ct do alvo *AtAREB1* foram subtraídos do Ct da referência endógena lectina em cada amostra, resultando no valor de ΔCt . O cálculo final para o número de cópias é 2 elevado a média de $-\Delta Ct$ ($2^{-\Delta Ct}$), onde o número 2 corresponde à somatória das eficiências do gene alvo (100% = 1) e do controle endógeno (100% = 1).

As reações de amplificações foram conduzidas em triplicatas biológicas e técnicas no termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem), nas seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 min, denaturação de 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min.

5.2.6 Quantificação do Número de Insetos do Transgene Via *Southern blotting*

Os valores do número de cópias do(s) transgene(s) obtidos para as amostras T_0 e T_1 pela técnica de RT-qPCR foram validadas utilizando a metodologia de *Southern blotting* (Southern, 1975). Para isso, o DNA dos tecidos foliares das plantas de soja geneticamente modificadas foram extraído utilizando-se o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com modificações. Para essa etapa foi utilizado cerca de 1mg de cada material macerado em nitrogênio líquido, sendo depois adicionado 1 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM de TRIS-HCl, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl, 2% de β -mercaptoetanol) e a solução incubada a 65°C por 1h, agitando-se a cada 15 min. Em seguida 1 mL foi adicionado de clorofórmio à solução, agitada por 5 min e centrifugado a 8.000 rpm por 10 min. A fase aquosa (800 μ L) foi transferida para um novo tubo e 600 μ L de isopropanol foi adicionado, a solução agitada e incubada em -20°C, por 1h para precipitação do DNA genômico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 400 μ L de TE contendo 40 μ g/mL de RNase, e incubado a 37°C por 1h. Transcorrido este período 400 μ L de clorofórmio foi acrescentado à solução, agitada por 5 min e centrifugada a 14.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi então transferido (400 μ L) para um novo tubo, onde foi adicionado 40 μ L de acetato de sódio (3 M) e 1 mL de etanol 100%. A solução foi agitada e mantida a 37°C, por 30 min. Em seguida os materiais foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min, adicionados 200 μ L de etanol 70%. A solução foi novamente centrifugada a 14.000, por 5 min, e o *pellet* obtido foi mantido em temperatura ambiente por 30 min para secagem e transcorrido este período, o *pellet* foi ressuscitado em 50 μ L de água ultrapura.

Para verificar a qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a uma eletroforese com tampão SB 1X (NaOH 500 mM) em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e visualizadas sob luz UV em aparelho transluminador. A quantificação do DNA foi realizada em Nano Drop ND100.

Para o preparo das digestões genômicas das amostras 10 μ g de DNA e 50U da enzima *HindIII*, foram utilizados na linearização do plasmídeo (Figura 3). As reações de digestão foram incubadas a 37°C por 16h. Os fragmentos

digeridos foram separados em gel de agarose a 0,8%, por um período de 3h. Após a eletroforese, a membrana utilizada para a hibridização foi preparada mergulhando-se o gel das digestões na solução de depuração, e agitando-se suavemente por 10 min. Posteriormente, os géis foram mergulhados na solução de desnaturação por 30 min, e finalmente na solução de neutralização por 30 min, sempre agitando-se levemente. O aparato foi então montado para posicionar o gel sob a ponte, e pela imersão do papel filtro na solução de transferência (10xSSC) *overnight*, o DNA do gel foi transferido para a membrana de nylon (Papel Whatmann 3MM), por capilaridade, por 18h. Após a transferência, a membrana foi lavada em tampão SSC 2X por 5 min, e seca em estufa, à 80°C. A membrana foi então pré-hibridizada com a solução de hibridização *ULTRAhyb™ Ambion* (NaCl 0,5 M, reagente de bloqueio 4%) a 42°C, por 2h.

Para a construção da sonda, um conjunto de *primers* (Set 1) que amplifica somente a região codante do gene de interesse foi sintetizado (Tabela 3). Depois da reação de PCR e eletroforese, as amostras foram purificadas do gel utilizando o *kit DECAprime* e a região contendo o gene *AtAREB1* foi marcada *overnight* com fósforo radioativo. A sonda foi marcada utilizando-se [³²P] d-CTP pela técnica de "*random priming*" seguindo-se as recomendações do fabricante.

Tabela 3 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a marcação da sonda nas análises de *Southern blot*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' -> 3')	Fragmento amplificado (pb)
Southern1-35S-Areb1	F TGATGAGTTTCAGAGCAGTG R TCTCCTGATTCTTTGCATT	1083

A reação de hibridização foi conduzida a 42°C, pelo período mínimo de 18 h, em solução de hibridização, contendo aproximadamente 30 ng/mL de sonda. Após o período de incubação, a membrana foi lavada duas vezes em solução de lavagem primária (uréia 2 mol/L; SDS 0,1%; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM; MgCl₂ 10 mM e reagente de bloqueio 0,2%) durante 10 min, a 42°C para a retirada do DNA não hibridizado e do excesso de sonda e por fim, as membranas foram colocadas para exposição em filme fotográfico Kodak *BioMax*.

5.2.7 Análise da Expressão Constitutiva via RT-qPCR

O RNA total foi extraído de todas as amostras da geração T₁ (com exceção de A2889.03) com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. O tratamento com DNase foi realizado com 10 µg dos RNAs, *Buffer* 10X, 10 µg de DNase e completado para o volume final de 25 µL com DEPC *water*, deixado por 15 min em temperatura ambiente e posteriormente adicionado EDTA 25 nM e incubado por mais 10 min à 65°C. Para verificar a presença de DNA genômico “contaminante”, as amostras foram tratadas com a enzima transcriptase reversa, amplificadas por PCR com *primers* que amplificam íntrons de *β-actina* e comparadas com o DNA genômico de BR16 (controle positivo) no gel de integridade pelo tamanho das bandas amplificadas. Esses *primers* amplificam uma região intrônica do gene de *β-actina*, logo, amostras contendo somente cDNA amplificarão um fragmento menor quando comparados em gel de agarose com o controle positivo. Amostras com presença de DNA genômico “contaminante” podem amplificar dois fragmentos de tamanhos distintos, ou caso a síntese de cDNA não tenha sido bem sucedida, somente uma banda seria visualizada no gel.

Para a síntese dos cDNAs foram utilizados aproximadamente ~200 ng dos RNAs tratados com DNase, 50 µM de Primer Oligo(dT) e 10 mM de dNTP, incubados por 5 min à 65°C e imediatamente por 1 min no gelo. O *mix* de cDNA *Synthesis* foi preparado com 10X RT *buffer*, 25 mM de MgCl₂, 0,1 M de DTT, 40 U/µL de RNase Out e 200 U/µL de *SuperScript* III RT (*Reverse Transcriptase*). Em seguida, 10 µL do *mix* foi adicionado ao RNA/*primer*, homogeneizado e incubado por 50 min à 50°C, 5 min à 85°C e acondicionado em gelo. Finalizando, foi adicionado 1 µL de RNase H e incubado por 20 min à 37°C.

Após a diluição seriada de uma amostra GM contendo a construção gênica 35S:*AREB1*, a reação de eficiência dos *primers* foi realizada utilizando-se um normalizador da soja, o gene *Gmβ-actina* (Tabela 4). As placas das reações foram montadas com os cDNAs diluídos, 0,2 µM de *primers* F e R, 1X kit *Platinum*® *SYBR Green*® e H₂O milliQ. As amostras foram amplificadas para o gene alvo *AtAREB1* e para o gene de referência endógeno *Gmβ-actina* (acesso GMU60500) validado por Stolf-Moreira e colaboradores (2011). Foi utilizado o kit *Platinum*® *SYBR Green*® qPCR *SuperMix*-UDG *with* ROX, conforme as instruções do fabricante e as

condições de ciclagem foram as mesmas da etapa de quantificação de transgenes. Nessa reação também foi realizada a curva de dissociação para verificar a ocorrência de formação de dímeros de *primers* e/ou amplificação de produtos inespecíficos.

Tabela 4 – Sequências de *primers* dos genes *AtAREB1* e *Gmβ-actina* utilizados para análise de expressão constitutiva dos transgenes.

<i>Primers</i>	Sequência (5' -> 3')	Fragmento amplificado (pb)
RT-35S-<i>Areb1</i>-F	GGAGGTGGAGGGTTGACTAGA	66
RT-35S-<i>Areb1</i>-R	CACTGCTCTGAAACTCATCAAACG	
<i>Gmβ-actina</i>-F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	118
<i>Gmβ-actina</i>-R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	

As placas foram montadas com os cDNAs das amostras GMs, normalizadas com a *Gmβ-actina*, calibradas com a amostra A2992.01 com menor expressão dentre os eventos (cerca de 173 vezes mais expresso que o normalizador) e testadas nas condições de ciclagem citadas acima. A análise estatística dos dados foi realizada com o teste T (paramétrico) com um valor para nível de significância igual à 5%.

5.2.8 Análises de Proporção e Segregação dos Transgenes

O teste de segregação ou zigosidade pode ser realizado por PCR convencional, identificando-se a presença ou a ausência do transgene nas amostras da geração T₂. Em termos práticos, dependendo da disponibilidade de tempo e da quantidade de amostras, duas opções podem ser consideradas: ou se faz primeiramente o teste de zigosidade (eventos em homozigose são aqueles em que toda sua descendência é positiva para o transgene) e depois se determina o número de cópias apenas para as plantas T₁ homozigotas, poupando trabalho de levar adiante linhagens hemizigotas; ou inicialmente se determina a quantidade de transgenes pela RT-qPCR e posteriormente se realiza a análise de segregação. Para esta última opção, a escolha das plantas para análise da segregação deve ser feita com os eventos com mesma quantidade de transgene que o calibrador, ou o mais próximo possível; e selecionando também aqueles cuja expressão gênica seja satisfatória dentro do seu delineamento experimental. Neste trabalho, eventos com

poucas cópias foram selecionados por RT-qPCR e *Southern* para posteriormente ser realizado o teste de segregação. Um evento GM com elevada quantidade de cópias foi também selecionado para experimentos comparativos, visto que sua expressão relativa foi muito menor do que a dos eventos com poucas cópias.

Para verificar se a segregação do gene *AtAREB1* estava de acordo com a segregação Mendeliana foi realizado o teste χ^2 ($p \leq 0.05$) para todos os eventos.

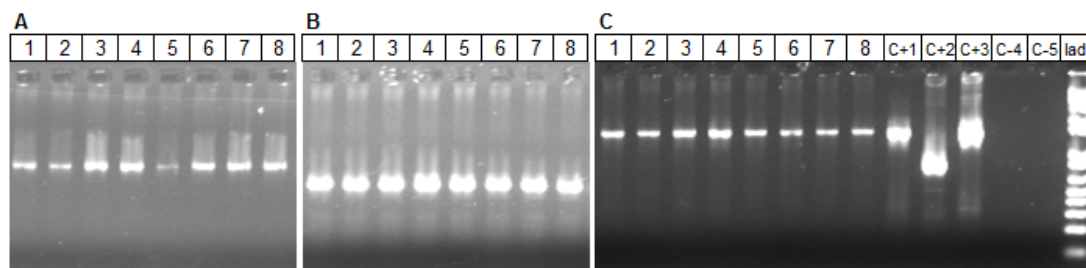
5.3 RESULTADOS

5.3.1 Eventos Quiméricos e GMs com o Gene *AtAREB1*

Dependendo do genótipo, a soja pode ser considerada uma espécie recalcitrante para as metodologias de transformações genéticas. Especialmente utilizando a biobalística, não é fácil obter eventos estáveis e com poucas cópias do transgene. Um total de 1585 embriões de soja foram transformados com a construção *35S:AREB1*. O DNA genômico foi extraído de um total de 1218 amostras e testadas para a presença dos cassetes inseridos, via PCR convencional. A variação entre o número de embriões transformados e o número de embriões 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.

Foram obtidos um total de doze eventos positivos para construção gênica *35S:AREB1*, sendo oito eventos confirmados como positivos (Figura 4) e quatro eventos identificados como quiméricos. As linhagens de soja GMs identificadas como positivas para a construção *35S:AREB1* foram: A24, A2057, A2058, A2856, A2889, A2904, A2992 e A3019 (*a numeração ultrapassa o total de transformações pois esta não foi a única construção bombardeada inclusa na metodologia deste trabalho).

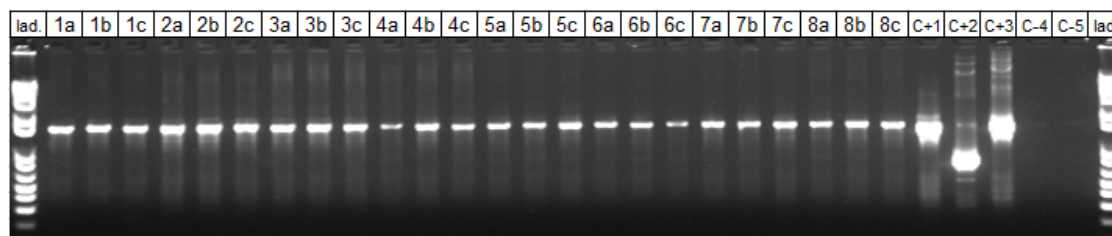
Fig. 4 – PCR convencional das linhagens de soja identificadas como positivas para a construção gênica *35S:AREB1*.



As amostras foram amplificadas com diferentes conjuntos de *primers*. **a)** O conjunto de *primer Areb1-6* se anela do início da região promotora até o início da região codante e amplifica um fragmento de 904 pb. **b)** O conjunto de *primer Areb1-7* se anela do meio do promotor até o final da região codante e amplifica um fragmento de 639 pb. **c)** O conjunto de *primer Areb1-8* se anela entre as regiões do final do promotor até o início da região terminadora e amplifica um fragmento de 1502 pb. Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de *AtAREB1*; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: *ladder* 1 Kb Plus.

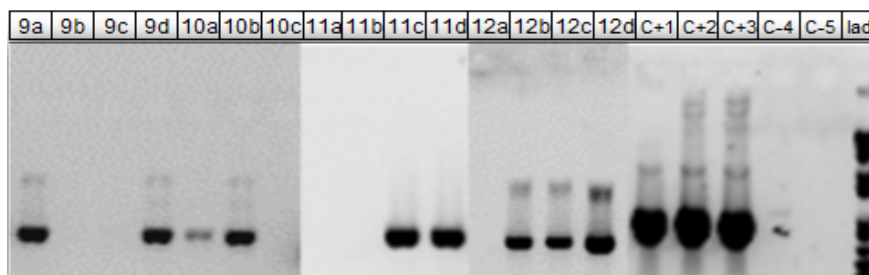
A formação de tecidos quiméricos é muito frequente no processo de transformação de plantas, e identificá-los e descartá-los é de fundamental importância para que se consiga uma descendência com eventos transgênicos estáveis. Todas as oito plantas identificadas como positivas também foram confirmadas como não quiméricas para o teste de quimera (Figura 5), utilizando diferentes amostras foliares de DNA de uma mesma planta amplificada com os três conjuntos de *primers* (somente *primer 1-8* mostrado). Já os eventos A3178, A3297, A3301 e A2078 foram considerados quiméricos para a construção inserida testadas com o conjunto de *primers Areb1-6* (Figura 6).

Fig. 5 – PCR convencional realizado com as plantas positivas para verificar a possível ocorrência de eventos quiméricos para a construção *35S:AREB1*.



Diferentes amostras de DNA dos tecidos foliares foram coletadas (*a*, *b*, *c* e *d* na figura) e amplificadas com o conjunto de *primer Areb1-8*, que se anela entre as regiões do final do promotor até o início da região terminadora, amplificando um fragmento de 1502 pb. Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de *AtAREB1*; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: *ladder* 1 Kb Plus.

Fig. 6 – PCR convencional realizado com plantas de soja positivas mas identificadas como quiméricas para a construção 35S: *AREB1*.



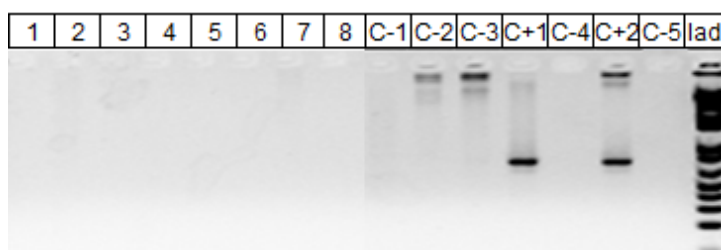
Diferentes amostras de DNA dos tecidos foliares foram coletadas (*a*, *b*, *c* e *d* na figura) e amplificadas com o conjunto de *primer Areb1-6*. Legendas = 9: A3178; 10: A3297; 11: A3301; 12: A2078; C+1, C+2 e C+3: controles positivos, plasmídeos com diferentes construções de *AtAREB1*; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: *ladder* 1 Kb Plus.

A eficiência das transformações foi calculada de acordo com Rech et al. (2008), onde a mesma é dada pelo número total de plantas transgênicas férteis dividido pelo número total de explantes transformados. Uma eficiência de transformação de 0,75% (12 eventos positivos/1583 embriões transformados) foi obtida. Esta eficiência de transformação é baixa se comparada à eficiência de 9% obtida por Rech et al. (2008), porém é corroborada por dados de literatura, que indicam que a inserção de qualquer gene exógeno via biobalística depende de muitas variáveis. Não há um sistema eficiente de transformação genética para muitas cultivares em soja (Homrich et al., 2008), pois muitas respondem de forma desigual ao processo de transformação. Droste et al. (2002) transformaram via biobalística duas cultivares de soja, a IAS5 e a Bragg, e os resultados mostraram que a cultivar Bragg apresentou uma maior sensibilidade ao processo de transformação em relação a cultivar IAS5. Além de processos biológicos, outros processos físicos e químicos também devem ser levados em consideração, pois as condições de um dia de transformação raramente se igualam à dos demais.

Outro resultado que merece análise foi quanto a co-transformação obtida para o gene *ahas*, uma vez que em nenhum dos eventos obtidos confirmados para o gene 35S:*AREB1* foram também confirmados para a presença do gene de seleção (Figura 9). Não podemos acessar o resultado da eficiência obtida pelo bombardeamento de ambas as construções, uma vez que foram testadas para inserção do gene *ahas* somente as oito plantas confirmadas como positivas para o gene *AtAREB1*. Ou seja, não obtivemos as plantas pela seleção através do herbicida, o que gerou um trabalho bem maior. Alguns estudos mostraram que embora a eficiência de co-transformação em trabalhos realizados via *Agrobacterium*

tumefaciens apresente uma ampla variação (de 10 a 90%) (Ebiuma et al., 2001), a taxa de co-transformação esperada em soja via biobalística segundo Rech et al. (2008) seria de 40%. A hipótese conjunta que explicaria este dado é que dois fatores estariam contribuindo para esse resultado. Primeiro, a diferença de tamanho dos plasmídeos co-bombardados de aproximadamente 3500 pb: 5122 pb para o plasmídeo contendo o gene de interesse *AREB1* e 8673 pb para o gene de seleção *ahas*. Uma competição entre os plasmídeos pode ter ocorrido, uma vez que, plasmídeos menores tendem a serem introduzidos com maior frequência que plasmídeos maiores. No trabalho de Rech et al. (2008), o plasmídeo *ahas* é de fato bem menor (5718 pb) que o utilizado neste trabalho, e talvez esta diferença de tamanho entre os plasmídios explique a incoerência de resultados com o trabalho citado. Uma solução para este problema seria o uso de uma concentração maior do plasmídeo pAC321 tornando o processo de inserção mais eficiente. Paralelamente, e em complemento a estes dados, o agente seletivo Imazapir foi utilizado em uma concentração menor do que a recomendada visando a regeneração de um maior número de embriões transformados, ainda que a ocorrência de escapes tenha sido prevista. Logo, essa baixa concentração do agente seletivo deve também ser considerada como fator relevante nos resultados finais, uma vez que, a seleção negativa dos explantes ficou comprometida, talvez até mesmo influenciando a níveis moleculares a integração e a estabilidade do plasmídeo *Ahas* dentro do genoma da planta.

Fig. 7 – PCR mostrando os oito eventos T₀ caracterizados como positivos para o gene *AtAREB1* mas negativos para o plasmídeo contendo o gene *Ahas*.



Legendas = 1: A24; 2: A2856; 3: A2889; 4: A2904; 5: A2057; 6: A2058; 7: A2992; 8: A3019; C+1 e C+2: controles positivos, plasmídeos contendo a construção *ahas*; C-1 à C-3: controles negativos com as diferentes construções de *AtAREB1*; C-4 e C-5: controles negativos, BR16 e branco, respectivamente; lad.: *ladder* 1 Kb Plus.

Cabe ressaltar que, por um lado a eficiência de co-transformação foi inesperada, um resultado inédito que gerou um volume maior de trabalho, além de

também ter levantado a questão de se realizar o bombardeamento com um único plasmídeo contendo o gene de interesse e gene marcador juntos ou com plasmídeos de tamanhos parecidos e uma concentração do agente seletivo previamente adaptado para uma seleção ótima. Por outro lado, resultou em um “efeito colateral” onde as plantas de soja GMs não apresentaram o gene marcador de seleção, eliminando uma fase futura de multiplicação para segregar o material co-transformado visando obter plantas somente com o gene de interesse, caso esta fosse uma necessidade.

A descendência dessas oito linhagens *AtAREB1* positivas e sem o gene marcador de seleção pode ser observada na Tabela 5. Dos oito eventos positivos identificados para o gene *AtAREB1*, seis transmitiram o transgene para a geração T₁ (A24, A2057, A2856, A2889, A2904 e A2992), e foram plantados em casa de vegetação para multiplicação de sementes (Figura 10).

Tabela 5 – Descendência das PGMs de soja sem marcador de seleção obtidas com o gene *AtAREB1*.

Evento T ₀	Total de sementes <i>AtAREB1</i> (T ₁)	Positivas
A24	23	14 de 23
A2057	7	5 de 7
A2058	4	0 de 4
A2856	15	1 de 15
A2889	12	10 de 12
A2904	13	2 de 13
A2992	4	2 de 4
A3019	2	0 de 2
Total	82	34

Fig. 8 – Bancada em casa de vegetação com os seis eventos GMs de soja em geração T₁ para multiplicação de sementes.



Baseados na caracterização molecular e genética de alguns eventos GM acompanhados por mais de dois anos, Romano e colaboradores (2005) concluíram que os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação dos transgenes foram recombinações intracromossomais, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido, e co-eliminação dos transgenes ativado por algum processo de defesa do genoma da planta. Algum desses mecanismos talvez possam explicar a não transmissão dos transgenes dos eventos GMs A2058 e A3019 para sua descendência. Além disso, conforme discutido mais adiante, o evento A2058 apresentou alto número de cópias dos transgenes e possivelmente rearranjos muito complexos levando a perda dos mesmos, fato corroborado pelo observado em seu desenvolvimento extremamente comprometido em casa de vegetação, produzindo apenas quatro sementes, e todas negativas. O mesmo pode ter acontecido com o evento GM A3019, com um grau ainda maior de subdesenvolvimento (duas sementes), o que impossibilitou a extração de material para as análises de RT-qPCR e *Southern*. Outro evento GM com baixo desenvolvimento foi o A2992, que produziu somente quatro sementes T₁, sendo duas identificadas como positivas. Os resultados obtidos para o número de cópias deste evento são discutidos mais adiante.

5.3.2 Número de Cópias do Transgene via RT-qPCR e *Southern Blotting*

A soja apresenta genoma diplóide ($2n=4x=40$), logo, a análise dos resultados deve ser cautelosa, pois o que se está quantificando pela técnica de quantificação relativa é na verdade a quantidade do transgene em relação ao calibrador endógeno. Isso quer dizer que se as amostras GMs apresentassem Ct's iguais ao calibrador, teriam as duas cópias alélicas. Nas plantas transformadas, geração T_0 , sabe-se que o número de cópias é o mesmo que o número de inserções, pois o transgene está em hemizigose. Já para sua descendência (T_1) pode-se inferir o número de cópias de acordo com sua zigosidade, dado que só pode ser confirmado com a análise da geração T_2 observando se a prole é toda homozigota pela presença do transgene, ou comparando com dados de Southern e discutindo as possíveis correlações.

Em muitos trabalhos o termo inserto se refere à presença física de um cassete de expressão no genoma, por exemplo, uma planta diplóide homozigota com duas cópias tem na verdade quatro insertos (podendo estar no mesmo locus ou em loci diferentes), e uma planta hemizigota com duas cópias tem dois insertos (da mesma forma, mesmo locus ou em cromossomos distintos). Após a autofecundação de uma planta T_0 hemizigota com dois insertos (duas cópias), a planta T_1 pode ter cinco possíveis números de inserções, se não houver duplicações e rearranjos: 0, 1, 2, 3 e 4. Os resultados de RT-qPCR pelo método $2^{-\Delta Ct}$ para esta geração revelaria nenhum transgene (0), metade (1), o mesmo (2), um e meio (3) ou duas vezes (4) mais quantidade de transgene do que o calibrador endógeno com uma cópia (Bubner & Baldwin, 2004). Ou seja, o resultado apresentado é em quantidade de transgene, e não expresso em número exato de cópias, sendo necessário interpretar bem os dados e compará-los com os resultados de Southern e da segregação a partir da geração T_2 .

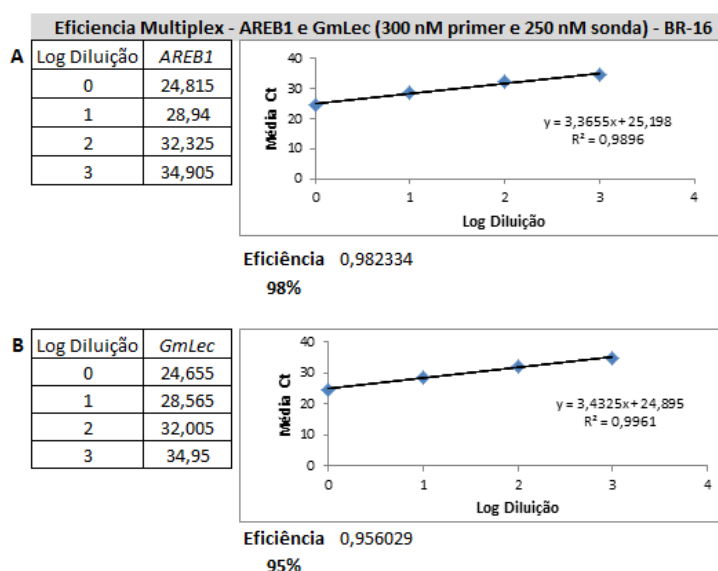
Plantas que possuem a mesma quantidade de transgene que o calibrador (duas cópias alélicas) não são necessariamente plantas com uma cópia, elas podem ser hemizigotas para dois loci. Assim, análises de segregação com as sementes T_2 devem ser realizadas para confirmar se uma planta com dois insertos é homozigota (todas as sementes T_2 serão positivas) ou hemizigotas para dois loci

(proporção da segregação de 15:1). No caso de *linkage* próximo dos dois loci hemizigotos, a proporção da segregação deverá ser 3:1 (Bubner; Baldwin, 2004).

Outro dado importante que deve ser levado em consideração é o Desvio Padrão, pois as triplicatas realizadas nos experimentos podem variar muito seus Ct's, o que induziria à resultados não muito precisos, chegando até uma cópia de diferença. Bubner e Baldwin (2004) estabeleceram esse valor em não mais que 0,3 para as triplicatas. Porém, a qualidade do DNA extraído para as análises pode não ser muito boa quando se trabalha com extrações massivas, o que interfere um pouco no desvio. Logo, a acurácia de Ct's com desvios acima de 0,3 vai diminuindo (Bubner; Baldwin, 2004). A magnitude dos Ct's também influencia no desvio, assim é necessário padronizar bem a reação para o anelamento dos *primers* e quantidade de DNA, sendo ideal que os Ct's não ultrapassem 25.

Os resultados de eficiência dos conjuntos de *primers* utilizados indicaram que a eficiência de amplificação foi de 98% para o transgene *AtAREB1* e 95% para o gene *GmLec* (Figura 9).

Fig. 9 – Determinação da eficiência do sistema *multiplex TaqMan* para os alvos *AtAREB1* e endógeno *GmLectina*.



Uma amostra GM foi diluída serialmente 4X e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema multiplex para os alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. **a)** Estimativa da eficiência do gene *AtAREB1* com *slope* = 3,3655. **b)** Estimativa da eficiência do gene *GmLec* de referência endógena com *slope* = 3,4325.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da quantidade de transgene introduzidos na soja para os eventos positivos. As plantas T₀ estão

destacadas em cores seguidas pelas plantas da geração T_1 de seu respectivo parental. Para os eventos A2856 e A2058 não foi possível determinar o número de cópias do transgene para a geração T_0 e T_1 , respectivamente, pela técnica de RT-qPCR. Para o evento A3019, não havia material biológico suficiente para coletar e desenvolver a metodologia, conforme comentado no tópico anterior. Os resultados dos Ct's estão em Anexo, mostrando que poucos eventos tiveram seu desvio padrão acima de 0,3; e também que somente para o gene endógeno lectina nas amostras T_1 do evento A2057, os valores de Ct passaram um pouco de 25, sugerindo uma desorganização do genoma conforme será discutido mais adiante.

Tabela 6 – Número de cópias (quantidade de transgenes) obtidas de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$ via RT-qPCR para sete eventos de soja em geração T_0 e seis eventos em geração T_1 contendo a construção 35S:AREB1.

Eventos ^a	Quantidade de transgenes ^b	Eventos	Quantidade de transgenes	Eventos	Quantidade de transgenes
A2889 T_0	3	A24 T_0	5	A2904 T_0	5
2889.02	3	24.03	5	2904.09	9
2889.03	2	24.04	6	2904.10	8
2889.04	4	24.06	6	A2057 T_0	55
2889.05	3	24.07	5	2057.02	443
2889.06	4	24.08	5	2057.03	25
2889.07	3	24.09	6	2057.05	159
2889.08	4	24.10	5	2057.06	69
2889.09	3	24.11	5	2057.07	22
2889.11	4	24.13	6	A2992 T_0	3
2889.12	3	24.16	6	2992.01	30
A2856 T_0	ND ^c	24.18	5	2992.02	10
A2856.10	16	24.19	5		
A2058 T_0	12	24.21	5		
-	-	24.22	5		

- a, As plantas abaixo do evento em destaque são da geração T_1 ;
 b, Comparado com o gene endógeno GmLec (duas cópias alélicas). O valor usado na somatória das eficiências foi de 1,94;
 c, Não Determinado.

Para o evento primário de A2889, a técnica de RT-qPCR detectou três cópias, ou seja, um e meio mais quantidade de transgenes do que o calibrador endógeno lectina, considerando que a comparação é feita com duas cópias alélicas da referência endógena. Isso pode significar que a planta possui uma ou duas cópias por genoma haploide (n), independente se cada cópia esta em hemi- ou homozigose.

Analisando a geração T_1 dessa mesma planta A2889, e comparando com os dados obtidos por Southern (Figura 10b), pode-se inferir que este evento

apresenta uma única inserção, pois observa-se um padrão de banda única e similar em todos os eventos provenientes da geração T₁. Comparando-se ainda os dados de Southern com os resultados de RT-qPCR, é possível inferir que este evento apresenta uma ou duas cópias, possivelmente com cópias em tandem caso seja hemizigota, ou duas a quatro cópias alélicas caso seja homozigota. Porém, essas interpretações só podem ser confirmadas com a análise de segregação da geração T₂. Pela análise da proporção de segregação deste evento em T₁, o gene *AtAREB1* segregou de acordo com Mendel na proporção de 3:1 (Tabela 7), sugerindo que sua integração foi no mesmo locus gênico e seu comportamento de um único gene dominante (Zhao et al., 2007).

Fig. 10 – Southern blot das plantas de soja geneticamente modificadas com a construção gênica 35S:AREB1. a) Hibridização de sete eventos da geração T₀. b) Hibridização dos trinta e quatro eventos da geração T₁. Controle negativo = BR16.

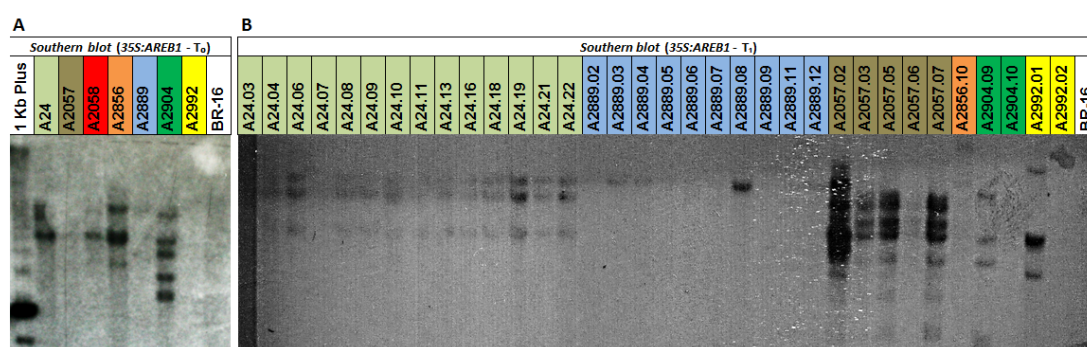


Tabela 7 – Proporção da segregação do gene *AtAREB1* em geração T₁ dos seis eventos GMs obtidos com a construção 35S:AREB1.

	Total de plantas T ₁	Positivas (F _o)	Negativas	Total / 4	Fe	Proporção da segregação	χ^2	P (%)
A2889	12	10	2	3	9	3:1	0,1111	NS
A24	23	14	9	5,75	17,25	~3:2	0,6123	NS
A2057	7	5	2	1,75	5,25	3:1	0,0119	NS
A2904	13	2	11	3,25	9,75	1:3	6,1603	S
A2992	4	2	2	1	3	1:1	0,3333	NS
A2856	15	1	14	3,75	11,25	1:15	9,3389	S

Legenda: Fo = Frequência observada; Fe = Frequência esperada; $\chi^2 = (F_o - F_e)^2 / F_e$; NS = Não Significativo/ S = Significativo.

Da mesma forma, quando os dados obtidos por RT-qPCR e por *Southern* para o evento A24 foram comparados, os resultados mostraram coerência após as interpretações (Tabela 6 e Figura 10). Na planta T₀ desse evento, cinco cópias foram detectadas pelo método de quantificação relativa, ou seja, duas vezes e meio mais quantidade do gene exógeno do que o gene calibrador endógeno. Desconsiderando as possibilidades de zigosidade, o evento A24 possui em seu genoma três cópias por genoma haplóide; ou, dentre algumas possibilidades considerando sua zigosidade, poderia ter duas cópias em homozigose e uma outra em hemizigose (cinco cópias).

Analisando o resultado de *Southern* para esse evento, distinguimos três insertos na planta primária, padrão que se repetiu de forma similar para toda a geração T₁, assim como a quantidade de transgenes detectada pelo RT-qPCR entre as duas gerações, com alguns eventos chegando a ter três vezes a quantidade de transgenes do calibrador (seis cópias). Provavelmente estes eventos apresentem três cópias, com seis cópias alélicas (se homozigotos) ou três cópias em hemizigose. A proporção de segregação deste evento também demonstrou segregação Mendeliana (Tabela 7) com herança dominante do transgene, provavelmente para mais de um loci, porém, próximos entre si.

O evento A2904 também foi caracterizado com um número relativamente baixo de cópias, sendo que para a planta transformada (T₀), o resultado de RT-qPCR detectou também duas vezes e meio mais quantidade de transgene do que o calibrador (Tabela 6), dado coerente também com o resultado de cinco inserções detectado pelo *Southern* (Figura 12a). O que o torna um evento mais complexo é o fato desta planta provavelmente possuir cinco inserções em diferentes loci. A proporção de sua descendência não está de acordo com o esperado (Tabela 7), o que sugere a ocorrência de rearranjos ou duplicações, como pode ser observado pela diferença das quantidades de transgenes nos dados de RT-qPCR. Este dado não pode ser confirmado utilizando a técnica de *Southern*, visto que somente para uma das duas plantas T₁ (A2904.09) obtivemos boa digestão do material genômico (Anexos). A proporção de 1:3 (transgene para tipo selvagem) sugere a integração dos transgenes em diferentes loci gênicos, possivelmente eventos hemizigóticos (entre três e cinco cópias) com duplicações.

Outro importante evento caracterizado foi o A2057, considerado promissor para estudos comparativos de expressão e possivelmente silenciamento gênico. Este material foi o que apresentou o maior número de cópias pelos resultados de RT-qPCR, sendo que dois eventos em T₁ apresentaram quantidades de transgenes superiores à 100 (Tabela 6). Não foi possível quantificar os insertos que se integraram na geração T₀ ou geração T₁ deste evento por Southern (Figura 10), mas provavelmente foram acima de 10 cópias, dado corroborado pelos dados de quantificação relativa. Fenotipicamente, o evento A2057 apresentou porte reduzido (*dwarf phenotype* – fenótipo anão) tanto para a planta transformada (T₀) quanto para as plantas da geração T₁ (dados não mostrados). Esta característica de comprometimento do desenvolvimento e metabolismo da planta é muito comum em PGMs com cópias excessivas do transgene inserido, pelo efeito posicional da(s) inserção(ções) que podem comprometer genes do metabolismo primário ou ainda pela atividade constitutiva do promotor 35S (Kim et al., 2004), além de outros possíveis desarranjos nos cromossomos. Por extensão, esse evento não gerou muitas sementes T₁ se comparado aos outros eventos T₀, que apresentaram baixo número de cópias (Tabela 5). Interessantemente, o evento segregou de forma Mendeliana (Tabela 7).

Quando o evento A2058 (obtido no mesmo dia de transformação que A2057) foi analisado, observou-se que a planta T₀ também se desenvolveu muito pouco e produziu poucas sementes, não transmitindo o gene exógeno para sua descendência (Tabela 5), sugerindo também alguma forma de efeito posicional na região genômica de sua(s) inserção(ções), sendo assim perdido de uma geração para outra. Pelos dados de RT-qPCR, essa planta apresentou doze vezes mais quantidade de transgene, possivelmente seis cópias (Tabela 6). Embora se observe três ou quatro bandas na hibridização deste evento por *Southern* (Figura 10a), não foi possível avaliá-lo de forma precisa pois a baixa qualidade do DNA (Anexos) comprometeu a quantificação do número de inserções.

As plantas A2992 e A2856 foram consideradas de difícil interpretação, sendo impossível inferir muitos dados quando as duas técnicas foram comparadas devido à baixa qualidade dos materiais biológicos (Anexos). A planta transformada do evento A2992 apresentou por RT-qPCR três vezes mais transgenes que o gene endógeno, ou uma cópia e meia, número que se multiplicou

para sua geração T_1 (Tabela 6). Observando sua segregação, pode-se dizer que o transgene segregou Mendelianamente na proporção de 1:1 (Tabela 7), mas comparando os dados de ambas metodologias fica difícil inferir com certeza quantas cópias seus descendentes possuem no genoma. É comum que ocorram discrepâncias quando rearranjos complexos acontecem no genoma hospedeiro. Já para o evento A2856, o evento T_0 apresentou três inserções por *Southern*, no entanto não foi possível quantificar este evento por RT-qPCR devido à falta de material biológico para testar. Sugere-se que esta planta tenha apresentado pelo menos três cópias que segregaram de maneira bastante complexa e não-Mendelianamente (Tabelas 6 e 7). Também não foi possível comparar eficientemente ambas as técnicas utilizadas devido à falta de material ou baixa qualidade da digestão (Anexos). Fenotipicamente, o desenvolvimento desta única planta T_1 do evento A2856 não foi comprometido (dados não mostrados), como seria esperado analisando os resultados de RT-qPCR, que indicou pelo menos a presença de oito cópias no genoma deste evento.

O número de cópias inserido por biobalística variou de poucas até incontáveis cópias, e comparando os dados de RT-qPCR e *Southern* (Tabela 8) os resultados foram coerentes após as devidas interpretações.

Tabela 8 – Comparação das técnicas de quantificação de número de cópias e insertos em plantas de soja GM contendo o gene *AtAREB1*, excluindo interpretações sobre a zigosidade dos eventos.

Eventos	Quantidade de transgenes por RT-qPCR	Inserções por Southern	Número de cópias	Eventos	Quantidade de transgenes por RT-qPCR	Inserções por Southern	Número de cópias
A2889 T _o	3	ND <i>a</i>	1-2	A2904 T _o	5	5	3-5
2889.02	3	1	1-2	2904.09	9	3-5	3-5
2889.03	2	1	1	2904.10	8	ND	3-5
2889.04	4	1	2	A2057 T _o	55	ND	>10
2889.05	3	1	1-2	2057.02	443	ND	>10
2889.06	4	1	2	2057.03	25	ND	>10
2889.07	3	1	1-2	2057.05	159	ND	>10
2889.08	4	1	2	2057.06	69	ND	>10
2889.09	3	1	1-2	2057.07	22	ND	>10
2889.11	4	1	2	A2058 T _o	12	ND	6
2889.12	3	1	1-2	-	-	-	-
A24 T _o	5	3	3	A2992 T _o	3	ND	ND
24.03	5	3	3	2992.01	30	ND	ND
24.04	6	3	3	2992.02	10	ND	ND
24.06	6	3	3	A2856 T _o	ND	3	3-?
24.07	5	3	3	A2856.10	16	ND	8
24.08	5	3	3				
24.09	6	3	3				
24.10	5	3	3				
24.11	5	3	3				
24.13	6	3	3				
24.16	6	3	3				
24.18	5	3	3				
24.19	5	3	3				
24.21	5	3	3				
24.22	5	3	3				

a,ND = Não Determinado.

5.3.3 Expressão Relativa de *AtAREB1* em Relação ao Gene Endógeno *Gmβ-actina*

Pela presença no cassete de expressão de um promotor *CaMV 35S*, fortemente reconhecido pelo complexo basal de transcrição, é esperado que o transgene apresente uma super-expressão (*Up-regulated*) quando comparado à um gene de expressão basal constitutivo (normalizador). Os genes *AtAREB1* e *Gmβ-actina* amplificaram com eficiências próximas, de 80 e 88%, respectivamente (Figura

11), e sem ocorrência de dímeros de *primers* ou amplificação de produtos inespecíficos conforme observado na curva de dissociação da reação (Anexos).

Todos os eventos GMs testados foram *up*-regulados, sendo que A2889, A24, A2904 e A2856 tiveram as maiores expressões do transgene em relação ao normalizador (Figura 12). Dentro dos descendentes de A2889 algumas amostras expressaram mais que outras, assim como para o evento A24. Isso pode ser devido a vários fatores, dentre eles a segregação independente de cada evento, do efeito posicional ou também pela zigosidade da planta, considerando que linhagens homozigotas possam ter expressões maiores do transgene. A planta A2856.10 apresentou uma alta expressão relativa do gene exógeno, e considerando a possibilidade da presença de oito cópias que não segregaram Mendelianamente (Tabelas 6 e 7), este resultado sugere que suas cópias não tenham sido influenciadas nem pelo efeito posicional e nem mesmo por possíveis silenciamentos devido à metilações em sua região de inserção (TGS).

Fig. 11 – Eficiência dos *primers* de *AtAREB1* e *Gmβ-actina* utilizados para a normalização da reação de quantificação da expressão relativa dos eventos da geração T₁ obtidos pela técnica de RT-qPCR.

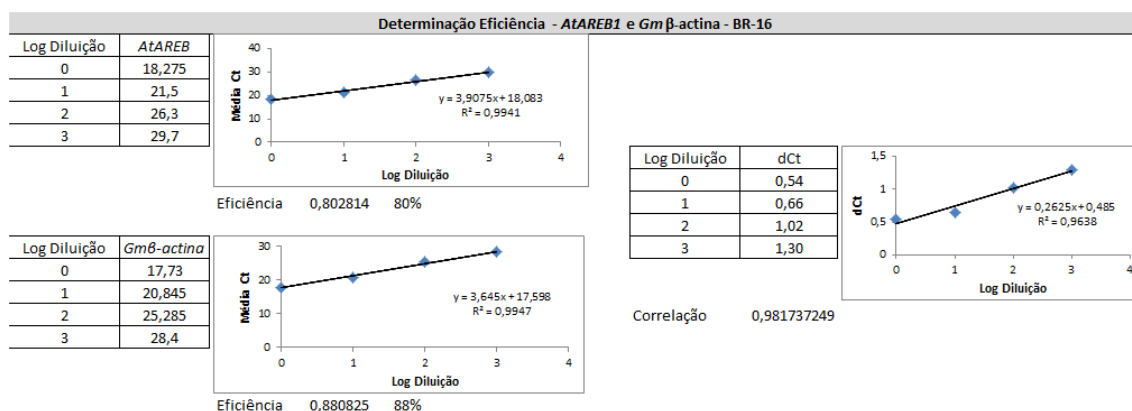
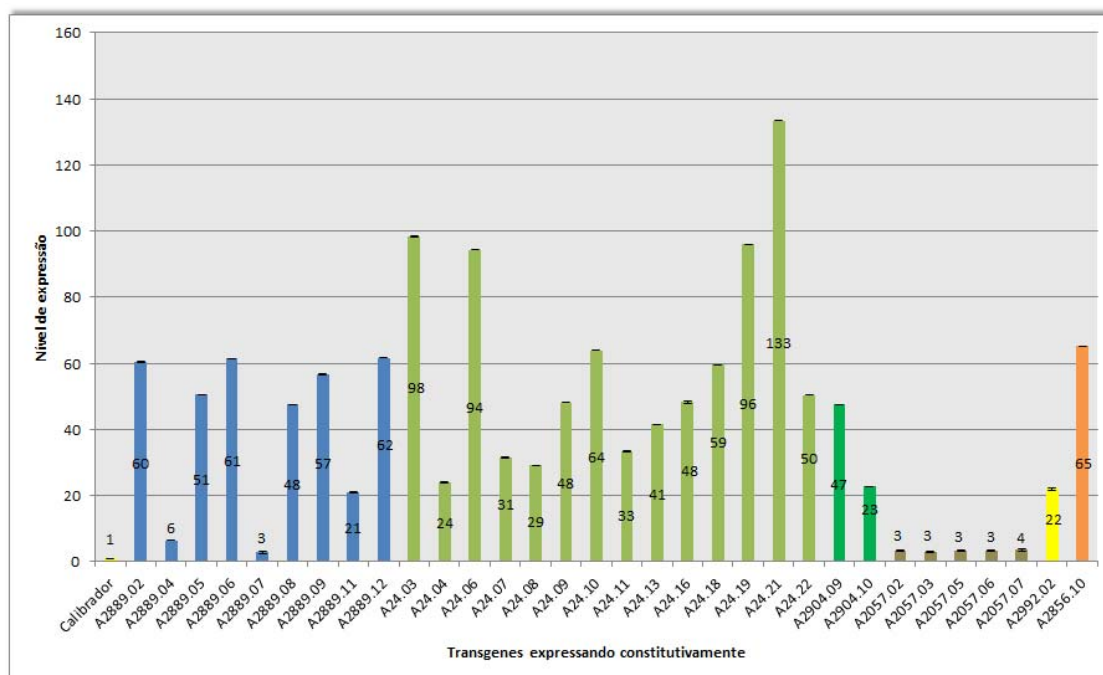


Fig. 12 – Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtAREB1* na geração T₁ dos seis eventos obtidos em relação ao calibrador (A2992.01), sem indução de estresse. A expressão do transgene foi normalizada com o gene *Gm β -actina* e calibrada com o evento A2992.01 pela menor expressão relativa dentre os eventos obtidos. As análises foram realizadas com teste T a nível de significância de 5%.



A menor expressão relativa dentre os eventos, de acordo com o esperado pelos dados obtidos com o número de cópias e segregação foi do evento A2057 (Figura 12). Pela presença de inúmeras cópias, possíveis rearranjos, duplicações e efeitos de posição, sua expressão relativa foi muito baixa comparada com os outros eventos (com exceção de A2889.04 e A2889.07). Além disso, pode-se inferir que os mecanismos de silenciamento, seja ele PTGS ou TGS, podem talvez ter contribuído para este resultado. Ainda que um “escape” tenha ocorrido, sua expressão é baixa em relação às outras plantas analisadas. Este evento pode ser considerado um bom genótipo para estudos de silenciamento gênico e de expressão de genes presentes dentro dessa rede regulatória, comparando-o com outros eventos candidatos (*35S:AREB1*) e com o controle (BR16 não transformada). Outro evento com expressão gênica relativa baixa foi o A2992, sendo que A2992.01 teve de fato a menor expressão dentre todos os seis eventos obtidos (Figura 12) e foi utilizado como calibrador para a análise dos resultados. O evento A2889.07 que também apresentou baixa expressão do transgene pode ainda ser considerado interessante para estudos de efeito posicional e/ou silenciamento, com a ressalva de

6 DISCUSSÃO

Em experimentos que visam analisar genes presentes dentro de redes regulatórias e cascatas de expressão gênica, é necessário que se tenha informações moleculares básicas sobre os eventos a serem avaliados. Neste trabalho, selecionamos três eventos considerados os melhores candidatos à futuros testes de expressão gênica com base nos resultados obtidos. São eles A2889, A24 e A2057. Dentre estes três, A2889 e A24 apresentaram poucas cópias do transgene na geração T₁, segregando de forma Mendeliana e com elevada expressão relativa do gene de interesse. Estresses hídrico e osmótico previstos em experimentos complementares à esse trabalho permitirão checar a expressão de vários genes *up-* e *downstream* pelo fator de transcrição *AtAREB1* inserido na soja, sendo ele mesmo responsável pela ativação de muitos desses genes. A presença de poucas cópias é importante em estudos de expressão, pois muitas cópias podem levar à desarranjos cromossômicos, silenciamento e outros efeitos que acabam dificultando a interpretação da real interação entre as moléculas. Além disso, sob uma situação de estresse os genes endógenos da soja também estariam sendo ativados, existindo a possibilidade de uma competição de várias moléculas pelo ABA, ou possivelmente até uma cooperação entre os fatores bZIPs.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que o número de cópias variou de poucas cópias para alguns eventos (A24, A2889, A2904) até dezenas e centenas inseridas em outros eventos (A2057). Os eventos com baixo número de cópias e alta expressão relativa selecionados foram o A2889 e A24, com uma ou duas e três cópias, respectivamente. Este resultado indica que a biobalística ainda pode ser considerado um método simples e eficaz de ser utilizado, gerando eventos com baixo número de cópias, mas também com inúmeras cópias. Por meio de análise visual observou-se que, com exceção do evento A2057, o desenvolvimento dessas PGMs 35S:*AREB1* não foi significativamente afetado se comparado à BR16 (controle), embora análises de crescimento fossem necessárias para afirmar qual a correlação estatística dessas diferenças.

Alguns dos eventos tiveram uma proporção de segregação mais complexa, sendo que a integração de múltiplas cópias, perdas de transgenes e a interação da expressão gênica, constituem um dos principais motivos para isso

ocorrer (Zhao et al., 2007). A natureza do genoma hospedeiro, do transgene e das interações entre eles também parecem contribuir para a segregação não-Mendeliana dos transgenes (Yin et al., 2004).

O método de quantificação relativa comumente encontrado na literatura é o que utiliza a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), porém, neste trabalho uma derivação dessa fórmula (método $2^{-\Delta Ct}$) foi utilizada para determinação do número de cópias do transgene. Neste método não é necessária a calibração com uma amostra previamente caracterizada com uma cópia por genoma haplóide, pois se utiliza o próprio gene endógeno (com uma cópia e homocigoto) como calibrador. Os resultados apresentados sugerem que esta metodologia é eficiente, desde que validada por um bom delineamento da reação e posteriormente por *Southern* (para número de cópias). Para fins de um *screening* inicial, categorização e seleção de eventos com diferentes números de cópias essa é uma metodologia eficiente para ser aplicada, sem a necessidade de um calibrador conhecido.

Considerando os resultados obtidos, três eventos candidatos foram selecionados avaliando-se não somente o número de cópias mas também o nível relativo de expressão gênica. Estes dados são importantes para testar os genes da cascata ABA-dependente em plantas de soja GMs sob estresse hídrico e aplicação de ABA, uma vez que se espera a super-expressão do transgene modulado sob a atividade do promotor constitutivo *CaMV 35S*. Os eventos selecionados são A2889 e A24, previamente selecionados também pelo número de cópias, e A2057, com cópias excessivas do transgene *AtAREB1*. Esses três eventos possuem o mesmo *background* genético (BR16), porém, são contrastantes em termos de desarranjos nos loci de inserção do(s) transgene(s), o que os tornam interessantes em termos comparativos. Por exemplo, eventos T₁ A2889 e A24 possuem entre uma e três cópias, sendo que muitos deles possuem alta expressão relativa; já eventos da geração T₁ de A2057 carregam inúmeras cópias com expressão relativa muito menor. Provavelmente, os genes presentes dentro dessas redes regulatórias dependentes de ABA devam responder em diferentes níveis moleculares, agrônômicos e fenotípicos dentro de cada genótipo, mostrando a importância ou não do transgene ser super-expresso, levando-se em consideração competições ou cooperações dentro do genoma hospedeiro. Para comparar os dados efetivamente, ainda foram selecionados três linhagens de cada evento pelo nivelamento de suas

respectivas expressões gênicas relativas. Assim, se houver discrepâncias entre as respostas obtidas nos resultados sabemos que isso não será devido à diferença de expressão dos transgenes. Dentro do evento A2889 foram escolhidas as sementes 06, 09 e 12; para A24, as sementes 03, 06 e 19; e 05, 06 e 07 para o evento A2057.

A busca de estratégias moleculares para diversas culturas de importância agrônômica tem se expandido muito desde o início dessa terceira fase de PGMs. A engenharia genética que visa obter plantas com tolerância à seca manipula um traço muito complexo, tendo em vista o conhecimento prévio da existência de inter-relações (*cross-talk*) entre diversas vias regulatórias de outros estresses abióticos, como o calor, o frio e a salinidade. Gao e colaboradores (2011) super-expressaram o gene *GmbZIP1* em trigo, tabaco e *Arabidopsis*, e nessas plantas constataram um aumento da tolerância ao déficit hídrico e à outros estresses abióticos. Os autores consideraram o gene endógeno um recurso genético interessante para espécies tolerantes à diversos estresses. Deve-se, portanto, ainda discutir com base nos resultados obtidos como ocorrerá essa competição, cooperação e/ou interação do gene *AtAREB1* com o gene endógeno nas plantas obtidas.

Finalizando, como o conhecimento sobre a rede de sinalização de estresses ainda é muito limitado, um dos desafios atuais nesta área de pesquisa é identificar e entender os elementos de sinalização desconhecidos dentro dos modelos de vias regulatórias já descritos (Yang et al., 2010). Com esses desafios a serem superados, será possível elaborar uma forte estratégia na obtenção futura de plantas de soja mais tolerantes ao estresse hídrico, sem comprometer seu desenvolvimento e produção; assim como sem desequilibrar outras vias de tolerância abiótica, e mesmo bióticas. Esta é, inclusive, uma característica prevista para a próxima geração de PGMs, onde o ganho de funções obtido com as três primeiras gerações poderão ser agregados em um único genótipo.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O protocolo de transformação genética via biobalística se mostrou eficiente dentro das expectativas para este tipo de experimento (eficiência de transformação de 0,75%);
- ✓ O cassete de expressão *pBI35S Ω :AtAREB1* (*35S:AREB1*) foi inserido com sucesso em seis eventos independentes e estáveis dentro do genoma da soja, sendo avaliado também na geração T₁;
- ✓ A quantificação do número de cópias por duas técnicas diferentes da biologia molecular pode ser comparada e após as devidas interpretações se mostraram coerentes; além disso, uma derivação da fórmula comumente para metodologia de quantificação relativa por RT-qPCR foi utilizada, onde em substituição a um calibrador previamente caracterizado com o gene de interesse, utilizamos o próprio gene de referência endógeno;
- ✓ A proporção de segregação para a geração T₁ foi analisada e quatro dos seis eventos GMs segregaram Mendelianamente;
- ✓ A expressão relativa dos transgenes pode ser comparada ao gene de referência endógeno pela atividade constitutiva induzida pelo promotor *CaMV 35S*;
- ✓ Três eventos GMs candidatos foram selecionados levando-se em consideração os melhores resultados obtidos e o delineamento experimental comparativo idealizado para experimentos posteriores;
- ✓ Três sementes da geração T₂ de cada um dos três eventos candidatos foram selecionadas com base no nivelamento de suas expressões relativas para futuros experimentos;
- ✓ Novos estudos abordando parâmetros fisiológicos, agrônômicos e o nível de expressão de genes da rede regulatória ABA-dependente serão realizados visando à obtenção de dados complementares quanto à um possível aumento da tolerância a condições de déficit hídrico nas plantas de soja contendo o gene *AtAREB1*.

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em razão da grande quantidade de eventos positivos para o transgene *AtAREB1* ainda disponível para se trabalhar, pretende-se testar as sementes T₂ dos descendentes dos três eventos candidatos quanto à zigosidade e também pela presença ou ausência de *AtAREB1*. Com essas plantas GMs, alguns genes da cascata ABA-responsiva de soja serão analisados sob tratamentos de estresse hídrico e aplicação de ABA. Dentre os genes escolhidos, o próprio transgene inserido *AtAREB1* será analisado, e ainda as proteínas da classe LEA, RD29B, RAB18, AIL1; a fosfatase *Glyma14g37480*; a quinase *Glyma02g15330*; o gene ortólogo *Glyma02g14880* (*GmbZIP1*); e dois outros genes putativos que codificam para proteínas bZIPs em soja, um deles sendo um homólogo não publicado de *GmbZIP1* (*Glyma07g33600*) e o outro um fator *GmbZIP* (*Glyma13g22060*) não anotado e de classe diferente (provavelmente classe G dos fatores bZIPs). Estes resultados serão essenciais para a publicação de pelo menos dois artigos atuais e de relevância científica.

REFERÊNCIAS

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

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

BUBNER, B.; BALDWIN, I. T. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plant. **Plant Cell Reporter**, v.23, p.263-271, 2004.

CHEN, P-Y.; WANG, C-K.; SOONG, S-C.; TO, K. Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v.11, p.287-293, 2003.

CHOI, H.; HONG, J.; HA, J.; KANG, J.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.1723-1730, 2000.

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2012.

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.

DROSTE, A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica**, v.127, p.367-376, 2002.

EBIUMA, H.; SUGITA, K.; MATSUGANA, E.; ENDO, S.; YAMADA, K.; KOMAMINE, A. Systems for the removal of selection marker and their combination with a positive marker. **Plant Cell Reports**, v.20, p.383-392, 2001.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. 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, S. Q.; CHEN, M.; XU, Z. S.; ZHAO, C. P.; LI, L.; XU, H. J.; TANG, Y. M.; ZHAO, X.; MA, Y. Z. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.75, n.6, p.537-53, 2011.

HAO, Y-J.; WEI, W.; SONG, Q-X.; CHEN, H-W.; ZHANG, Y-Q.; WANG, F.; ZOU, H-F.; LEI, G.; TIAN, A-G.; ZHANG, W-K.; MA, B.; ZHANG, J-S.; CHEN, S-Y. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. **The Plant Journal**, v.68, p. 302-313, 2011.

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.2, p.522-531, 2008.

HUSSAIN, S. S.; KAYANI, M. A.; AMJAD, M. Transcription Factors as Tools to Engineer Enhanced Drought Stress Tolerance in Plants. **Biotechnological Progress**, v.27, n.2, 2011.

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

KIM, S.; KANG, J. Y.; CHO, D. I.; PARK, J. H.; KIM, S. Y. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. **The Plant Journal**, v.40, p.75-87, 2004.

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

MARCELINO, F. C. **Avaliação de resíduos transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. 132p. Tese (Universidade Federal de Viçosa/MG), p.132, 2006.

MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LUÈ-THY, J. Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). **Journal of AOAC International**, v.77, p.617-622, 1994.

MILLER, E. M. & NICKOLOFF, J. A. *Escherichia coli* Electrotransformation. **Methods in Molecular Biology**, v.47, 1995.

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

POLIZEL, A.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F.A.; STOLF, 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, 2011.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, v.3, n.3, p.1-10, 2008.

ROMANO, A.; VAN DER PLAS, L. H. W.; WITHOLT, B.; EGGINK, G., MOOIBROEK, H. Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, v.220, p.45-464, 2005.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v.98, p.503-517, 1975.

STOLF-MOREIRA, R.; LEMOS, E. G. M.; ABDELNOOR, R. V.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; PEREIRA, S. S.; OLIVEIRA, M. C. N.; NEPOMUCENO, A. L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.1, p.58-65, 2011.

TRAN, L-S. P.; QUACH, T.; GUTTIKONDA, S. K.; ALDRICH, D. L.; RAJESH, K.; NEELAKANDAN, A.; Molecular characterization of stress-inducible *GmNAC* genes in soybean. **Molecular Genetics and Genomics**, v.281, p.647-64, 2009.

UMEZAWA, T. Systems biology approaches to abscisic acid signaling. **Journal of Plant Research**, v.124, p.539-548, 2011.

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

YANG, S.; VANDERBELD, B.; WAN, J.; HUANG, Y. Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. **Molecular Plant**, v.3, n.3, p.469-490, 2010.

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

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.

ANEXOS

Tabela 10 – Soluções usadas nas reações de *Southern*.

Soluções	Volumes para 1L	Concentração
Solução de depuração		
HCl concentrado	17 ml	0.2 M
Água destilada	983 ml	
Solução de desnaturação		
NaOH	20.0 g	0.5 M
NaCl	87.7 g	1.5 M
ddH ₂ O até o volume final		
Solução de neutralização		
Tris Base	121.1 g	1 M
NaCl	175.4 g	3 M
pH 7.0 com HCl concentrado		
20xSSC		
NaCl	175.3	3 M
Na-citrate	88.2	0.3 M
ddH ₂ O até o volume final		

Fig. 13 – Digestão do DNA genômico de sete plantas de soja geneticamente modificadas contendo a construção *35S:AREB1*. **a)** Reação de digestão realizada com a enzima *Hind*III em sete amostras da geração T₀. **b)** Reação de digestão realizada com a enzima *Hind*III em todos os trinta e quatro eventos da geração T₁. BR16 = Controle positivo.

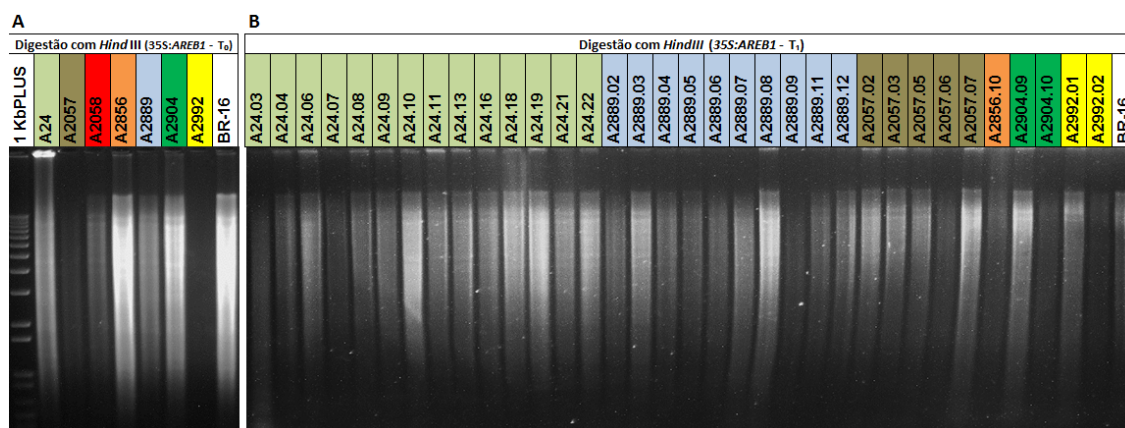


Fig. 14 – Curva de dissociação da reação de eficiência dos *primers* usados na qualificação relativa dos transgenes por RT-qPCR.

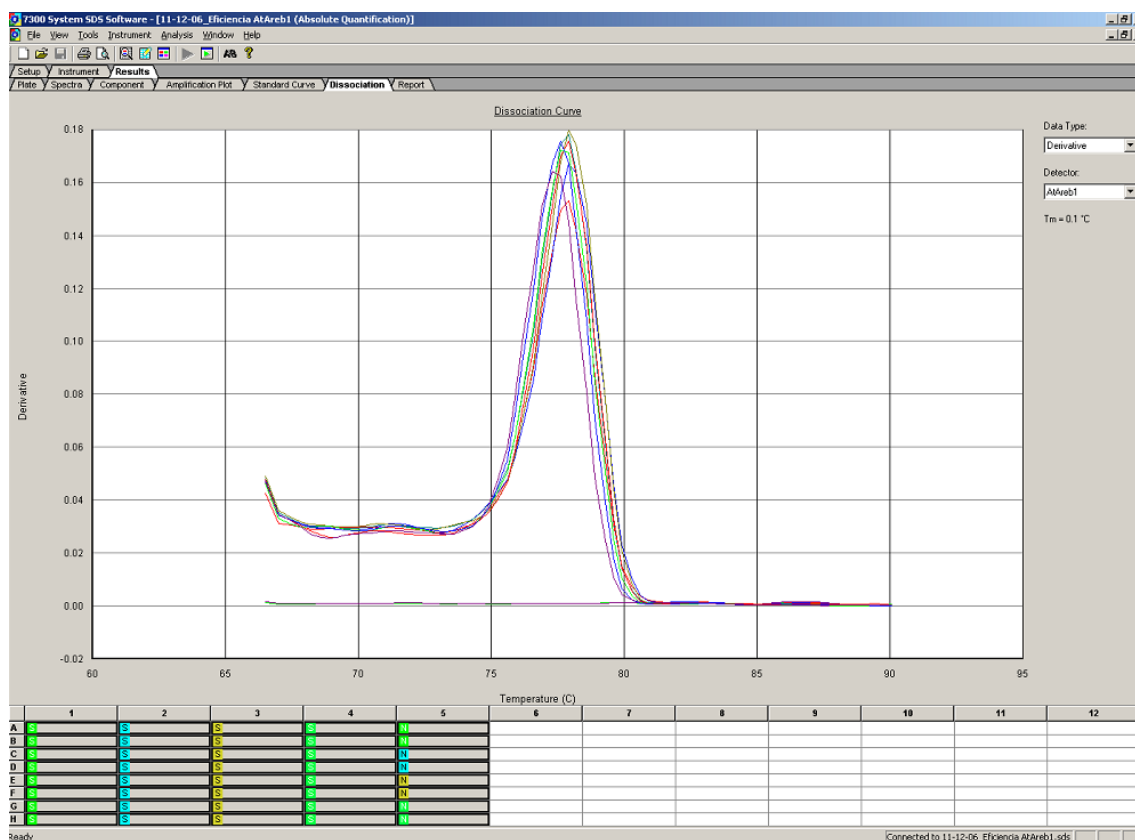


Tabela 11 – Valores dos Ct's das amostras amplificadas para o cálculo de número de cópias para a geração T_0 .

Amostras	Ct's		Desvio Padrão		$\Delta Ct a$	m $\Delta Ct b$	$2^{-\Delta Ct}$
	<i>AtAREB1</i>	<i>GmLec</i>	<i>AtAREB1</i>	<i>GmLec</i>			
24-FL	21,07	23,63	0,0	0,3	-2,56	-2,43	5
	21,04	23,62					
	21	23,14					
2057-FL	19,07	26,01	0,0	0,8	-6,94	-6,06	55
	19,07	24,9					
	19,15	24,55					
2058-FL	20,41	24,92	0,1	0,7	-4,51	-3,78	12
	20,15	23,65					
	20,28	23,62					
2889-FL	21,76	23,96	0,1	0,6	-2,2	-1,61	3
	21,87	23,28					
	21,58	22,8					
2904-FL	20,78	23,17	0,2	0,2	-2,39	-2,36	5
	20,52	22,96					
	20,5	22,76					
2992-FL	22,93	24,49	0,1	0,2	-1,56	-1,44	3
	23,03	24,45					
	22,82	24,17					

a, Média de Ct's do alvo – Ct's do endógeno;
b, Média dos ΔCt 's.

Tabela 12 – Valores dos Ct's das amostras amplificadas para o cálculo de número de cópias para a geração T₁.

Amostras	Ct's		Desvio Padrão		$\Delta Ct a$	m $\Delta Ct b$	2 ^Δ - ΔCt
	AtAREB1	GmLec	AtAREB1	GmLec			
24.03	19,73	22,24	0,1	0,1	-2,51	-2,49	5
	19,89	22,34			-2,45		
	19,83	22,34			-2,51		
24.04	19,78	22,17	0,3	0,3	-2,39	-2,35	5
	20,32	22,69			-2,37		
	20,27	22,56			-2,29		
24.06	19,43	22,02	0,2	0,3	-2,59	-2,60	6
	19,91	22,49			-2,58		
	19,79	22,41			-2,62		
24.07	19,93	22,48	0,1	0,1	-2,55	-2,39	5
	20,01	22,27			-2,26		
	20,08	22,44			-2,36		
24.08	19,65	22,1	0,2	0,2	-2,45	-2,36	5
	20,11	22,26			-2,15		
	20,04	22,53			-2,49		
24.09	20,14	23,02	0,2	0,1	-2,88	-2,73	6
	20,53	23,19			-2,66		
	20,4	23,04			-2,64		
24.10	19,34	21,68	0,4	0,5	-2,34	-2,44	5
	20,21	22,68			-2,47		
	19,85	22,35			-2,5		
24.11	20,08	22,31	0,1	0,2	-2,23	-2,42	5
	20,17	22,6			-2,43		
	20,02	22,61			-2,59		
24.13	20,07	22,61	0,1	0,2	-2,54	-2,68	6
	20,13	22,84			-2,71		
	20,24	23,03			-2,79		
24.16	20,45	23,08	0,1	0,1	-2,63	-2,64	6
	20,6	23,34			-2,74		
	20,72	23,27			-2,55		
24.18	19,74	22,26	0,1	0,1	-2,52	-2,57	5
	19,93	22,45			-2,52		
	19,89	22,55			-2,66		
24.19	19,88	22,39	0,3	0,3	-2,51	-2,55	5
	20,47	23,01			-2,54		
	20,28	22,88			-2,6		
24.21	20,13	22,7	0,4	0,4	-2,57	-2,55	5
	20,91	23,45			-2,54		
	20,66	23,21			-2,55		
24.22	20,17	22,52	0,2	0,2	-2,35	-2,46	5
	20,37	22,92			-2,55		
	20,47	22,94			-2,47		

Tabela 12 – Continuação.

Amostras	Ct's		Desvio Padrão		ΔCt^a	m ΔCt^b	2 $^{\wedge}$ - ΔCt
	AtAREB1	GmLec	AtAREB1	GmLec			
2889.02	21,61	23,13	0,0	0,1	-1,52	-1,41	3
	21,54	22,85			-1,31		
	21,63	23,02			-1,39		
2889.03	21,16	22,51	0,1	0,0	-1,35	-1,36	2
	21,19	22,53			-1,34		
	21,08	22,48			-1,4		
2889.04	20,58	22,67	0,1	0,1	-2,09	-2,09	4
	20,74	22,81			-2,07		
	20,64	22,76			-2,12		
2889.05	20,99	22,55	0,2	0,2	-1,56	-1,47	3
	21,31	22,82			-1,51		
	21,23	22,57			-1,34		
2889.06	21,14	23,2	0,2	0,2	-2,06	-2,08	4
	21,46	23,6			-2,14		
	21,29	23,33			-2,04		
2889.07	20,86	22,28	0,1	0,2	-1,42	-1,41	3
	20,99	22,45			-1,46		
	20,74	22,1			-1,36		
2889.08	20,4	22,48	0,1	0,0	-2,08	-2,09	4
	20,54	22,49			-1,95		
	20,33	22,56			-2,23		
2889.09	22,33	23,74	0,1	0,1	-1,41	-1,42	3
	22,37	23,85			-1,48		
	22,23	23,6			-1,37		
2889.11	21,71	23,09	0,4	0,5	-1,38	-1,39	3
	22,4	24,01			-1,61		
	22,39	23,58			-1,19		
2889.12	20,39	22,39	0,7	0,8	-2	-2,13	4
	21,69	23,93			-2,24		
	20,93	23,09			-2,16		
2057.02	16,49	24,89	0,3	1,0	-8,4	-9,20	443
	17,05	26,61			-9,56		
	16,96	26,59			-9,63		
2057.03	18,03	22,9	0,7	0,7	-4,87	-4,85	25
	19,24	24,13			-4,89		
	19,19	23,98			-4,79		
2057.05	17,39	24,76	0,6	0,9	-7,37	-7,65	159
	18,56	26,45			-7,89		
	18,33	26,02			-7,69		
2057.06	17,62	24,22	0,7	0,5	-6,6	-6,38	69
	18,83	25,13			-6,3		
	18,64	24,89			-6,25		
2057.07	19	23,59	0,0	0,2	-4,59	-4,69	22
	19	23,67			-4,67		
	19,08	23,88			-4,8		
2904.09	20,03	23,3	0,0	0,1	-3,27	-3,30	9
	20	23,2			-3,2		
	20,06	23,48			-3,42		
2904.10	20,42	23,62	0,2	0,3	-3,2	-3,23	8
	20,4	23,5			-3,1		
	20,68	24,06			-3,38		
2992.01	19,04	24,67	0,1	0,5	-5,63	-5,14	30
	19,02	23,93			-4,91		
	18,84	23,72			-4,88		
2992.02	20,04	23,55	0,0	0,0	-3,51	-3,46	10
	20,07	23,52			-3,45		
	20,05	23,46			-3,41		
2856.10	20,12	24,37	0,0	0,1	-4,25	-4,18	16
	20,17	24,38			-4,21		
	20,21	24,28			-4,07		

a, Média de Ct's do alvo – Ct's do endógeno;

b, Média dos ΔCt 's.