

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE SOJA CONTENDO O GENE
AtGolS2 SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Patrícia Teruko Honna
Bióloga

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE SOJA CONTENDO O GENE
AtGoIS2 SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Patrícia Teruko Honna

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2015

H773o Honna, Patrícia Teruko
Obtenção e caracterização molecular e fisiológica de plantas de
soja contendo o gene *AtGo/S2* sob déficit hídrico / Patrícia Teruko
Honna. -- Jaboticabal, 2015
viii, 70 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Sonia Marli Zingaretti, Liliane Marcia Mertz
Henning
Bibliografia

1. Estresses abióticos. 2. Galactinol sintase. 3. *Glycine max* L.
Merrill. 4. Rafinoses. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.528.1:633.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE SOJA CONTENDO O GENE *AtGols2* SOB DÉFICIT HÍDRICO”

AUTORA: PATRÍCIA TERUKO HONNA

ORIENTADORA: Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biologia Aplicada / Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SÔNIA MARLI ZINGARETTI

Universidade de Ribeirão Preto / Ribeirão Preto/SP

pl Profa. Dra. LILIANE MARCIA MERTZ HENNING

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Londrina/PR
Participação por videoconferência

Data da realização: 15 de outubro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRÍCIA TERUKO HONNA – nascida em 4 de julho de 1988, na cidade de Itaí - SP, é filha de Sussumu Honna e Amélia Tanaka Honna. Formou-se bióloga, em dezembro de 2010 pela Universidade Estadual do Norte do Paraná, – Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes - PR. Durante o curso de graduação, trabalhou no laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática na unidade da Embrapa Soja Londrina – Paraná, desenvolvendo trabalho na área de transformação genética visando a obtenção de plantas com maior tolerância à seca, sob orientação do pesquisador Dr. Alexandre Lima Nepomuceno. Em março de 2013, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, oferecido pelo programa de pós-graduação em Agronomia, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob orientação da professora Dra. Janete Aparecida Desidério.

Dedico e ofereço
Aos meus pais, por tudo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me guiarem e apoiarem em todos os momentos, apesar de todas as dificuldades;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, e às equipes de Ecofisiologia e Agrometeorologia da Embrapa Soja por toda ajuda;

À minha orientadora Dra Janete Aparecida Desidério por toda orientação, ajuda, ensinamentos, paciência, deixo aqui minha admiração e agradecimentos;

Aos professores do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Unesp - Jaboticabal pelos ensinamentos e dedicação;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, Dr. Leonardo Cesar Ferreira, Dra Renata Fuganti-Pagliarini, Silvana Regina Rockenbach Marin, pelos incansáveis ensinamentos, correções, dicas e apoio; Ao Dr. Norihito Kanamori por toda ajuda, sem vocês esse trabalho não seria possível;

À Dra Kazuko Yamaguchi Shinozaki, ao Dr. Junya Mizoi e aos amigos da Universidade de Tóquio pelos ensinamentos, conversas e grandes oportunidades;

Aos amigos Paulo, Gislaine, Daniel, Camila, Flávio, William, Liliane, Agnes, Cíntia, Jéssica, Alex, Gimbo, Tomomi e Lidiane obrigada pela companhia e pelos momentos inesquecíveis!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) pelo apoio financeiro, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa Soja pela estrutura física e ao *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS) pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Soja: cultura e importância econômica.....	3
2.2. Estresses abióticos.....	4
2.3. Mecanismos de resposta ao déficit hídrico.....	5
2.3.1. Respostas morfo-anatômicas e fisiológicas	5
2.3.2. Respostas moleculares ao déficit hídrico	7
2.4. Oligossacarídeos da família das rafinoses e a enzima galactinol sintase	9
2.5. O déficit hídrico e a biotecnologia no desenvolvimento de plantas mais tolerantes à seca	13
2.5.1. Uso de genes de vias metabólicas seca-responsivas no desenvolvimento de PGMs (Plantas Geneticamente Modificadas) mais tolerantes ao déficit hídrico...	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
3.1.1. Cassete de expressão e cultivo de <i>Agrobacterium</i>	22
3.1.2. Material vegetal e infecção dos explantes.....	23
3.1.3. Regeneração, seleção e identificação dos eventos.....	25
3.2. Análise da segregação dos transgenes na geração T ₁	26
3.3. Quantificação do número de cópias do transgene via qPCR	27
3.4. Análise da expressão constitutiva via RT-qPCR	28
3.5. Análise da expressão gênica via RT-qPCR.....	29
3.6. Parâmetros fisiológicos de linhagens GMs contendo a construção 35S: <i>AtGo/S2</i> em condições de déficit hídrico.....	30
3.6.1. Análise de parâmetros agrônômicos	32
3.7. Análise da taxa de sobrevivência e transpiração diária.....	32
3.8. Análise de crescimento	33
3.9. Análise estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Identificação de plantas de soja GMs contendo o gene <i>AtGo/S2</i>	35
4.2. Quantificação do transgene e taxa de segregação dos eventos	36

4.3. Quantificação da expressão do gene <i>AtGo/S2</i> em plantas da geração T ₁	40
4.4. Quantificação da expressão do transgene <i>AtGo/S2</i> em plantas de soja submetidas a déficit hídrico	41
4.5. Medidas de trocas gasosas e umidade gravimétrica do substrato	46
4.6. Análise de crescimento de plantas de soja GMs com o gene <i>AtGo/S2</i> sob déficit hídrico	48
4.7. Transpiração diária.....	51
4.8. Taxa de sobrevivência.....	52
4.9. Parâmetros agronômicos	53
5. CONCLUSÃO.....	56
6. REFERÊNCIAS.....	57

Certificado da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

Nº 218 SEXTA-FEIRA, 8 NOV 1996

DIÁRIO OFICIAL

SEÇÃO 3

23793

MINISTÉRIO DA ADMINISTRAÇÃO FEDERAL E REFORMA DO ESTADO

Secretaria Executiva
Subsecretaria de Assuntos Administrativos
Coordenação-Geral de Serviços Gerais

EXTRATO DO CONTRATO Nº 36/96

Contratantes: Ministério da Administração Federal e Reforma do Estado e a Alfa Engenharia, Materiais e Serviços. Processo nº 04100-000094/96-10. Modalidade de Licitação: Convite nº 001/96. Objeto: contratação de firma especializada para executar os serviços de impermeabilização da laje de cobertura do Bloco "A" da Esplanada dos Ministérios correspondente a 1.650 m², com fornecimento dos equipamentos, mão-de-obra e materiais necessários a execução dos serviços. Recursos: correrão à conta Programa de Trabalho: 0307002120080011, Elemento de Despesa 349039, Fonte 0100, Nota de Empenho nº 96NE00151, de 01/11/96, no valor de R\$ 147.885,00 (cento e quarenta e sete mil, oitocentos e oitenta e cinco reais). Vigência: será de 45 (quarenta e cinco) dias conforme cronograma de execução, contado de sua assinatura. Data e assinaturas: 06 de novembro de 1996. Pelo MARE: Almir Antonio Pereira de Oliveira. Pela Contratada: Raimundo Nogueira Neto.

(Of. nº 594/96)

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Secretaria Executiva

EXTRATO DE CONVÊNIO

ESPÉCIE: Termo Simplificado de Convênio.
CONVENIENTES: Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, CGC nº 01.263.896/0003-26; e o Centro Latinoamericano de Física - CLAF, CGC nº 27001866/0001-73.
REGISTRO: 01.0042.00/96.
OBJETO: Realização das seguintes atividades: "VII Workshop Anual de Usuários do LNLs: Workshop Associado: Luiz Sincrotron e Meio Ambiente; VII Mexican School of Particles and Fields/ Latin American Symposium on High Energy Physics; Latin American Network of Phenomenology of the Fundamental Interactions; Projeto de Pesquisa: Mapeamento do Campo de Velocidades Peculiares de Galáxias em Grande Escala; e Conselho Diretor do Centro Latino Americano de Física. (17ª Reunião).
VALOR: R\$ 31.500,00 (trinta e um mil e quinhentos reais), conforme Nota de Empenho nº 96NE01612, de 25/10/96, Unidade Orçamentária nº 240101, Programa de Trabalho nº 03010002140820001, Natureza da Despesa nº 345041, Fonte de Recursos nº 0100.
VIGÊNCIA: de 25/10/96 até 30/12/97.
DATA DE ASSINATURA: 25 de outubro de 1996.
ASSINAM: Pelo Concedente: LINDOLPHO DE CARVALHO DIAS/Secretário Executivo - CPF nº 003.017.287-04; Pelo CLAF: CARLOS ALBERTO ARAGAO DE CARVALHO FILHO/Diretor - CPF nº 337.000.447/04.

(Of. nº 230/96)

Subsecretaria de Assuntos Administrativos
Coordenação-Geral de Recursos Logísticos

RETIFICAÇÃO

No extrato de Notas de Empenho publicado no Diário Oficial da União de 2 de outubro de 1996, pág. 21098, onde se lê: LICITAÇÃO: Inexigível com base no Art. 24, Inc. II, ... Leia-se: Inexigível com base no Art. 25, Inc. II, ...

(Of. nº 230/96)

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

COMUNICADO Nº 1

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, de acordo com o artigo 2º, inciso XIII, do Decreto nº 1.752, de 20 de dezembro de 1995, torna público que a referida Comissão, em reunião ordinária realizada em 22 de outubro de 1996, apreciou e proferiu decisões nos seguintes processos administrativos:

I - Processo nº 01200.004073/96-39.
Interessado: Sociedade Agrícola Germinal.
CGC: 49.156.326/0001-00.

Endereço: Avenida Vicente Rios nº 90, caixa postal 21468, Brooklin Paulista, 04706-900, São Paulo - SP.
Assunto: Solicitação de emissão de Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB.

Decisão: Deferido, ficando atestada a idoneidade técnico-científica da instituição solicitante, assim como as instalações de sua sede, da estação experimental de Uberlândia - MG, situada na Rodovia BR 452, Km 142,54, Zona Rural, e da estação experimental de Cascavel - PR, situada na Estrada Capitão Leônidas Marques, Rodovia PR 182, Km 07, para avaliação de campo, avaliação de produto, produção comercial, comercialização, transporte, descarte e armazenamento de plantas de milho transgênicas, definidas pelo requerente, de acordo com o Anexo I da Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, como organismo do grupo I, esclarecendo-se que a liberação a campo de Organismos Geneticamente Modificados - OGMs só poderá ser realizada após autorização da CTNBio, mediante avaliação de proposta a ela submetida pela instituição, de acordo com normas específicas para tal.

II - Processo nº 01200.004009/96-30.
Interessado: Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSO/EMBRAPA.
CGC: 00.348.003/042-99.

Endereço: Rodovia Carlos João Strass - Acesso Ortado Amaral, Distrito de Warta, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina - PR.

Assunto: Solicitação de emissão de Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB.

Decisão: Deferido, ficando atestada a idoneidade técnico-científica da instituição solicitante, assim como das instalações de sua sede para pesquisa em regime de contação com plantas de soja (*Glycine max*), cultivar "BR-16", geneticamente modificada com o gene de tolerância a glifosato, ingrediente ativo do herbicida Roundup®, chamado "Roundup Ready TM", definidas pelo requerente, de acordo com o Anexo I da Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, como organismo do grupo I, esclarecendo-se que a liberação a campo de OGMs só poderá ser realizada após autorização da CTNBio, mediante avaliação de proposta a ela submetida pela instituição, de acordo com normas específicas para tal.

(Of. nº 230/96)

LUIZ ANTONIO BARRETO DE CASTRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

EXTRATOS DE INSTRUMENTOS CONTRATUAIS

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Lourdes Márcia Nogueira Leite PROCESSO: NR. 63.00.05/95-8. OBJETIVO: Banco de Dados de Fontes Energéticas da Amazônia. VALOR CUSTEIO: R\$ 12.000,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07776 e VALOR CAPITAL R\$ 38.000,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07777. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Lourdes Márcia Nogueira Leite.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Franz Josef Kaltner PROCESSO: NR. 63.00.12/95-4. OBJETIVO: Implantação de uma Micro-Usina de Extração de Óleo Vegetal Visando a Utilização em Motores de Combustíveis Múltiplos Para Geração de Energia Elétrica em Pequenas Comunidades. VALOR CUSTEIO: R\$ 38.155,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07808 e 96NE07794 e VALOR CAPITAL R\$ 152.000,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07795. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Franz Josef Kaltner.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Roberto de Moraes Miranda PROCESSO: NR. 63.00.02/95-9. OBJETIVO: Sistema Integrado de Produção e Utilização de Óleo de Densidade (Elaeis guineensis L.) Como Fonte de Energia Renovável Para as Condições do Estado do Amazonas. VALOR CUSTEIO: R\$ 129.896,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07809 e VALOR CAPITAL R\$ 145.000,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07810. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Roberto de Moraes Miranda.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Jorge de Andrade Filho PROCESSO: NR. 63.00.06/95-4. OBJETIVO: Tecnologias Alternativas para o Meio Ambiente Rural: aspectos técnicos e sócio-econômicos. VALOR CUSTEIO: R\$ 19.620,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07815 e VALOR CAPITAL R\$ 82.618,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07816. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Jorge de Andrade Filho.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Norbert Fenzl PROCESSO: NR. 63.00.07/95-0. OBJETIVO: Implantação de Microsistemas Energéticos na Comunidade João Coelho, Município de Santo Antônio do Tauá, Pará. VALOR CUSTEIO: R\$ 49.310,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07811 e 96NE07826 e VALOR CAPITAL R\$ 101.857,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07813. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Norbert Fenzl.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Paulo Eduardo Pizão PROCESSO: NR. 63.00.09/95-3. OBJETIVO: Avaliação do Potencial Anticâncer de Espécies Vegetais da Amazônia. VALOR CUSTEIO: R\$ 96.840,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07782 e VALOR CAPITAL R\$ 99.181,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07788. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Paulo Eduardo Pizão.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Pedro Luiz Braga Lisboa PROCESSO: NR. 63.00.04/95-1. OBJETIVO: Utilização e sustentabilidade de recursos biológicos na região das Ilhas, Baixo, Amazonas (Estado do Pará). VALOR CUSTEIO: R\$ 191.585,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07789 e VALOR CAPITAL R\$ 19.640,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07790. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Pedro Luiz Braga Lisboa.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: Georgini Augusto Venturieri PROCESSO: NR. 63.00.13/95-0. OBJETIVO: Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero Theobroma. VALOR CUSTEIO: R\$ 78.150,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07778 e VALOR CAPITAL R\$ 84.860,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07779. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: Georgini Augusto Venturieri.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: João Shojiro Tango PROCESSO: NR. 63.00.03/95-5. OBJETIVO: Produção Auto Sustentável de Energia na Zona Rural. VALOR CUSTEIO: R\$ 56.700,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07827 e VALOR CAPITAL R\$ 110.000,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07819. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: João Shojiro Tango.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: João Tavares Pinho PROCESSO: NR. 63.00.10/95-1. OBJETIVO: Sistema Híbrido Solar-Edício-Diesel para a Eletrificação de Sauá, Município de Marapanim, Estado do Pará. VALOR CUSTEIO: R\$ 37.424,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07828 e VALOR CAPITAL R\$ 163.700,00 NOTA DE EMPENHO: 96NE07821. VIGÊNCIA: 36 (trinta e seis) meses, a partir da data da liberação de recursos DATA DA FIRMATURA: 16/10/96. FORO: Brasília-DF. SIGNATÁRIOS: Pelo CNPq José Galizia Tundisi-Presidente - Pelo Beneficiário: João Tavares Pinho.

ESPÉCIE: Termo de Concessão e Aceitação de Auxílio Financeiro à Pesquisa CONCEDENTE: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. BENEFICIÁRIO: João

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA DE PLANTAS DE SOJA CONTENDO O GENE *AtGo/S2* SOB DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO – Com o atual cenário de mudanças climáticas, observa-se a tendência a eventos de seca mais longos e recorrentes, desta forma a obtenção de plantas mais tolerantes à seca figura como um dos principais investimentos dentro da ciência e tecnologia nacional. Os oligossacarídeos da família das rafinoses (RFOs) desempenham múltiplas funções nas plantas e sabe-se que estes são acumulados nos tecidos vegetais em situações de déficit hídrico, garantindo a estabilidade das membranas celulares, conseqüentemente mantendo as funções vitais da planta. Por sua vez, a enzima galactinol sintase (GoS, EC 2.4.1.123), catalisa o primeiro passo na biossíntese dos oligossacarídeos dos RFOs desempenhando um importante papel regulador na partição do carbono entre sacarose e RFOs. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi introduzir em soja, via *Agrobacterium tumefaciens*, a construção gênica 35S:*AtGo/S2* e caracterizar molecularmente e fisiologicamente os eventos obtidos sob déficit hídrico. Para o processo de transformação, a cultivar convencional de soja BRS 184 foi utilizada e os eventos obtidos foram caracterizados quanto ao número de cópias através da técnica de qPCR. Para a análise da expressão gênica constitutiva o RNA total dos eventos, em condições bem irrigadas, foi extraído e a expressão determinada via RT-qPCR. A taxa de segregação foi calculada através do teste do X^2 ($p \leq 0.05$). Com base nos resultados obtidos, dois eventos (21a1 e 21a4) foram selecionados para serem analisados quanto a respostas moleculares e fisiológicas sob déficit hídrico induzido em condições de casa de vegetação. Os resultados mostraram que nas plantas do evento 21a4 o maior acúmulo de água associado a menor área foliar na condição controle levou a manutenção das trocas gasosas causado pela redução na transpiração foliar, maior acúmulo de água no substrato e acúmulo de transcritos de rafinose e galactinol nos tecidos. Desta forma, o aumento dos teores destes carboidratos teria feito com que estes atuassem como osmoprotetores, tornando possível a recomendação das plantas 21a4 a programas de melhoramento que visem tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Estresses abióticos, galactinol sintase, *Glycine max* L. Merrill, rafinoses

OBTAINING AND MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SOYBEAN PLANTS WITH THE GENE *AtGolS2* UNDER WATER DEFICIT

ABSTRACT – With the current scenario of climate change, there is a tendency to longer and recurrent drought events, thus obtaining more drought tolerant plants figure as a major investment in the national science and technology. Raffinose family oligosaccharides (RFOs) plays multiple functions in plants and it is known that these are accumulated in plant tissues in water deficit situations, guaranteeing the stability of cell membranes, thus maintaining the vital functions of the plant. In turn, galactinol synthase (GolS, EC 2.4.1.123) catalyzes the first step in the biosynthesis of RFOs plays an important regulatory role in carbon partitioning between sucrose and orphans. Thus, our objective was to introduce gene construction 35S:*AtGolS2* via *Agrobacterium tumefaciens* in soybean plants and characterize molecularly and physiologically events obtained under water deficit. In this context, the conventional soybean BRS 184 was used in the transformation process and the soybean events were molecularly characterized in regard to the transgene copy number by qPCR technique. For the analysis of constitutive gene expression total RNA of events, well-watered conditions, was extracted and the expression determined by RT-qPCR. The segregation rate was calculated using the X^2 test ($p \leq 0.05$). Based on our results, two events (21a1 and 21a4) were selected to be analyzed for physiological responses under drought simulated under greenhouse conditions. The results showed that the plants 21a4 event the largest accumulation of water associated with lower leaf area in the control condition led to maintenance of gas exchange caused by the reduction in leaf transpiration, increased water accumulation in the substrate and accumulation of raffinose and galactinol transcripts in tissues. Thus, the increased levels of these carbohydrates would have made these act as osmoprotectors, enabling the recommendation of 21a4 plants breeding programs aimed at tolerance to drought.

Keywords: Abiotic stresses, galactinol synthase, *Glycine max* L. Merrill, raffinose

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico;
AF	Área foliar;
AREB	Responsive Element Binding protein;
BAP	6-Benzilaminopurina;
CaMV 35S	Promotor constitutivo do vírus do mosaico do tabaco;
CDH	Controle do déficit hídrico;
CMI	Comprimento médio de internos;
DH	Déficit Hídrico;
DREB	Dehydration Responsive Element Binding - Elemento ligante de resposta à desidratação;
FTs	Fatores de transcrição;
GMs	Geneticamente modificados;
Gmβact	Gene β -actina de <i>Glycine max</i> ;
GmLec	Gene Lectina de <i>Glycine max</i> ;
GmRS1	Gene Rafinose 1 de <i>Glycine max</i> ;
GmRS3	Gene Rafinose 3 de <i>Glycine max</i> ;
GOLS	Galactinol sintase (inositol-3- α -galactosil transferase);
Hsf	Heat Shock Fator - Fatores de transcrição de choque térmico;
JIRCAS	<i>Japan International Research Center for Agricultural Sciences</i> ;
LEA	Late Embryogenesis Abundant - embriogênese abundante tardia;
MÊS	Ácido 2-[N-morfolino] etano sulfônico;
MS	Murashige Skoog Basal Medium Salt – Meio salino Murashige Skoog;
MSCP	Massa seca de caules mais pecíolos;
MSF	Massa seca de folhas;
MSR	Massa seca de raízes;
MSS	Massa de substrato seco;
MST	Massa seca total;
MSTS	Massa seca total de sementes;
MSU	Massa de substrato úmido;
NNOS	Número de nós;
NPTII	<i>Neomycin phosphotransferase</i> ;

NSV	Número de sementes por vagem;
NTS	Número total de sementes;
NVCS	Número de vagens com sementes;
NVSS	Número de vagens sem sementes;
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase;
PL	Peso da lata;
RFO	Raffinose family oligosaccharides - Oligossacarídeos da família das rafinoses;
RFS	Raffinose synthase - Rafinose sintase;
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies reativas ao oxigênio;
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real;
SGT	Silenciamento gênico transcricional;
SGPT	Silenciamento gênico pós-transcricional;
STS	Stachyose synthase - Estaquiose sintase;
T_{0, 1, 2 ... n}	Segunda, Terceira, ... n, geração de um evento;
V_{1, 2 ... n}	Estádios vegetativos do desenvolvimento da soja;
UG	Umidade gravimétrica do substrato.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação esquemática da via de biossíntese dos RFOs.....	10
Figura 2 - Etapas para a infecção dos explantes.	24
Figura 3- Plantas T ₀ crescendo em casa de vegetação para avanço de gerações. .	35
Figura 4- PCR convencional realizado com as plantas da geração T ₁	37
Figura 5 - Comparação da expressão gênica relativa do transgene <i>AtGo/S2</i> na geração T ₁ sem indução de estresse..	41
Figura 6 - Nível de expressão do gene <i>AtGo/S2</i> na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle (CDH) e sob déficit hídrico (DH).	42
Figura 7 - Nível de expressão do gene <i>GmRS1</i> (A) e <i>GmRS3</i> (B) na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle e sob déficit hídrico	43
Figura 8 - Nível de expressão dos genes <i>LEA2</i> (A) e <i>LEA6</i> (B) na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle e sob déficit hídrico.....	44
Figura 9 – Trocas gasosas e umidade gravimétrica do substrato usado no cultivo de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção <i>AtGo/S2</i> e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184.....	47
Figura 10 – Parâmetros de crescimento de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção <i>AtGo/S2</i> e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184.....	49
Figura 11 - Parâmetros de crescimento de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção <i>AtGo/S2</i> e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184.....	50
Figura 12 - Transpiração diária das plantas <i>AtGo/S2</i> geneticamente modificadas e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184 durante 21 dias consecutivos de déficit hídrico..	52
Figura 13 – Taxa de sobrevivência de plantas de soja <i>AtGo/S2</i> geneticamente modificadas e o “background” a cultivar convencional BRS 184 após 21 dias de irrigação suspensa seguidos de nove dias de reidratação.....	53
Figura 14 – Parâmetros agrônômicos (por planta) de soja <i>AtGo/S2</i> geneticamente modificadas e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184.....	54

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Sequências “Forward” e “Reverse” do iniciadores utilizados, tamanho dos produtos de amplificação do transgene <i>AtGo/S2</i> inserido e dos diferentes genes selecionados para análises de quantificação e expressão.....	28
Tabela 2 - Proporção da segregação do gene <i>AtGo/S2</i> nas gerações T ₁ e T ₂ dos eventos GMs obtidos com a construção <i>35S:AtGo/S2</i>	37
Tabela 3- Número de cópias (quantidade de transgene) obtidas de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$ via qPCR para três linhas de dois eventos transgênicos de soja (2Ia1 e 2Ia4) em geração T ₁ e em geração T ₂ contendo a construção <i>35S:AtGo/S2</i>	38
Tabela 4 - Taxas de eficiência dos iniciadores do transgene <i>AtGo/S2</i> inserido e dos diferentes genes selecionados para análises de quantificação e expressão.	40

1. INTRODUÇÃO

Segundo o levantamento final de grãos da safra 2014/2015 realizado pela Conab, a produção total de grãos foi de 209,5 milhões de toneladas, 8,2% ou 15,9 milhões de toneladas a mais do que a última safra, quando foram colhidas 193,6 milhões de toneladas. A soja continua sendo destaque, com uma produção de 96,24 milhões de toneladas, 11,8% a mais do que na safra anterior. Entretanto, apesar dos números positivos e crescentes, fatores bióticos e abióticos vêm interferindo na produtividade da cultura, provocando perdas significativas aos produtores e prejudicando a economia de forma geral. Dentre esses fatores, o déficit hídrico tem sido considerado o mais importante. Estresses hídricos podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta, afetando a produtividade em diferentes níveis, dependendo do início do período de seca, além do grau e da intensidade do estresse. Os prejuízos causados pela seca, em soja, podem representar perdas de até 40% na safra. Neste cenário, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se obter cultivares de soja mais tolerantes que suportem as variações às quais as plantas estão sujeitas, diminuindo assim as perdas na produtividade.

Os carboidratos representam o segundo grupo mais abundante presente nas sementes de soja. Destes, cerca de 99% correspondem aos açúcares solúveis, tais como sacarose, estaquiose e rafinose, os quais além de serem utilizados como fonte de energia, são classificados como importantes carboidratos de translocação no floema vegetal. Os RFOs têm como uma de suas funções atuar durante os períodos de déficit hídrico, servindo como soluto compatível para proteção das células contra a dessecação. Os RFO são derivados de α - galactosil e sacarose, sendo que rafinose, estaquiose e verbascose são considerados componentes de reserva para as sementes. A via de síntese dos RFOs já está bem estabelecida, onde a enzima galactinol sintase ocupa o papel principal. Esta enzima catalisa o primeiro passo na biossíntese dos RFOs e desempenha um papel regulador importante na partição do carbono entre sacarose e RFOs. Sendo assim, plantas que sejam capazes de acumular grandes quantidades destes carboidratos podem se tornar mais tolerantes aos estresses abióticos.

Desta forma, tendo em vista as mudanças climáticas atuais e os cenários previstos para os próximos anos, os quais consideram o aumento da temperatura global e da frequência de eventos de seca, além da projeção do aumento da população para 9 bilhões de pessoas até 2050, faz-se necessário o desenvolvimento de cultivares de soja mais tolerantes aos estresses abióticos. O desenvolvimento de plantas e tecnologias que permitam a maior tolerância a longos períodos de estiagem são de extrema importância para a sustentabilidade da produção agrícola brasileira e mundial.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo introduzir em soja, via *Agrobacterium tumefaciens*, a construção gênica 35S:AtGolS2, caracterizar molecularmente os eventos obtidos quanto à expressão relativa e ao número de cópias; caracterizar o perfil de expressão do transgene inserido e de genes que codificam para os RFOs, assim como caracterizar as linhagens originadas quanto a parâmetros fitométricos, fisiológicos e agrônômicos sob condições de déficit hídrico em condições de casa de vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja: cultura e importância econômica

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma cultura originária da Ásia, mais precisamente da China. O cultivo da soja é muito antigo, com relatos que datam do ano de 2800 A.C. (CI Soja, 2011). Inicialmente, a cultura era restrita apenas ao Oriente, sendo introduzida no Ocidente por volta do século XV, pela Europa, mas apenas com finalidade de ornamentação. As primeiras tentativas de cultivo da soja na Europa não obtiveram sucesso, provavelmente devido a fatores climáticos e à ausência de conhecimento sobre a cultura. Apenas em meados do século XX, os norte-americanos conseguiram desenvolver o cultivo comercial da soja, criando variedades com maior teor de óleo, impulsionando seu cultivo. No Brasil, a introdução da cultura deu-se em 1882, sendo que os primeiros estudos iniciaram-se na Escola de Agronomia da Bahia. Em seguida, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) iniciou estudos para obtenção de cultivares adaptadas à região. No entanto, inicialmente o interesse pela cultura era apenas para aproveitamento como espécie forrageira e na rotação de culturas. Apenas no final da década de 1960, a soja passou a ser vista como produto comercialmente rentável, possibilitando, por exemplo, a sucessão com a cultura do trigo na Região Sul e também pelo aumento da demanda de farelo de soja gerado pelo início da produção de suínos e aves no país (EMBRAPA, 2011). Nas últimas cinco décadas, o cultivo da soja tem apresentado um crescimento superior à taxa de crescimento populacional, ocupando um importante papel na alimentação humana e animal (CARRARO, 2003).

A soja apresenta em sua composição vários fitoquímicos como isoflavonas, antocianinas e outros compostos, tais como tocoferol e saponinas, que atuam benéficamente na manutenção da saúde (MESSINA; MESSINA, 2010). O interesse pelas isoflavonas em soja teve aumento nos últimos anos após estudos comprovarem a relação entre seu consumo e a baixa incidência de certos tipos de câncer, entre outras doenças (STRAUSS et al., 1998; WU et al., 2008; YAN; SPITZNAGEL, 2009).

No quadro global, a produção mundial de soja da safra 2014/2015 foi estimada em 314,37 milhões de toneladas contra 283,7 na safra anterior. De acordo

com o relatório mensal de janeiro de 2015, a perspectiva de aumento na produção global foi impulsionada pelo Brasil, segundo maior produtor mundial da cultura (USDA, 2015).

No Brasil, a safra 2013/2014 atingiu 86,120 milhões de toneladas, representando um incremento de 5,7% em relação à safra anterior. A produção total do grão foi menor em relação à estimativa prévia devido a problemas relacionados ao clima durante o desenvolvimento da lavoura e durante a colheita do produto. Na safra 2014/2015, a área total destinada à semeadura do grão contou com um crescimento de 6,4%, passando de 30,1 para 32,1 milhões de hectares, ultrapassando a área destinada a milho e feijão. Desta forma, a produção de soja para a safra 2014/2015 foi de 96,24 milhões de toneladas, representando um incremento na produção de 11,8% em relação à safra 2013/2014 (CONAB, 2015).

2.2. Estresses abióticos

Os fatores de ordem ambiental que afetam o rendimento das culturas podem ser divididos em bióticos e abióticos. Os fatores bióticos consistem-se do conjunto de seres vivos que podem atuar sobre a cultura, tanto de forma benéfica quanto de forma maléfica. Todos os fatores não atribuíveis à atividade biológica podem ser incluídos como de ordem abiótica (EMBRAPA, 2005). Fatores climáticos como temperaturas extremas, seca e contaminação do solo por altas concentrações salinas são os estresses abióticos que mais limitam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, reduzindo a produtividade e, em casos extremos, podendo causar a morte (KRASENSKY; JONAK, 2012).

A evolução mundial da área de soja semeada nas últimas cinco safras foi de mais de 14%. Na safra 2010/2011, a área foi de 103,06 milhões de hectares, enquanto na safra 2014/2015 a estimativa foi de uma área de 117,82 milhões de hectares. Além disso, a produtividade teve aumento de 3% no mesmo período (SEAB, 2014). Mesmo com números positivos e crescentes, fatores bióticos e abióticos têm limitado a produtividade do cultivo da soja nos principais estados produtores do Brasil. Fatores ambientais adversos causaram na safra 2011/2012 uma redução de mais de 8 milhões de toneladas na cultura da soja, quando

comparado à safra 2010/2011. As perdas foram principalmente causadas pelo fenômeno “La Niña”, que atingiram sobretudo os estados da Região Sul, parte da região Sudeste e no Sudoeste de Mato Grosso do Sul (CONAB, 2012). Entre os estresses abióticos que afetam as culturas, a seca é considerada um dos mais preocupantes tendo um impacto crucial sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas, comprometendo assim a produção de alimentos para a população (GOLLACK; LÜKING; YANG, 2011). Desta forma a produção de plantas geneticamente modificadas que sejam capazes de tolerar mais eficientemente os episódios de seca, tem se mostrado um dos grandes desafios para a biotecnologia atual (GODFRAY et al., 2010).

Nos últimos anos, as estações mais quentes têm sido mais longas e as mudanças climáticas vêm causando invernos menos rigorosos (CRAUFURD; WHEELER, 2009). Tal fato aliado ao aumento da temperatura atmosférica têm causado o aumento do período de crescimento vegetativo para muitas culturas, alterando assim sua fenologia (MITTLER; BLUMWALD, 2010). Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que possam responder positivamente aos danos causados pelo déficit hídrico, tolerando prolongados períodos de seca, estendendo seu desenvolvimento e não afetando a produtividade da cultura (RIVERO et al., 2007).

2.3. Mecanismos de resposta ao déficit hídrico

2.3.1. Respostas morfo-anatômicas e fisiológicas

As respostas das plantas às variações ambientais envolvem uma série de mecanismos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, celulares e moleculares (FANG; XIONG, 2015). As plantas são organismos sésseis e, como tal, estão expostas a ambientes dinâmicos que frequentemente impõem dificuldades ao seu crescimento, resultando em significativas perdas no rendimento de espécies com importância econômica, como é o caso da soja (KULCHESKI, 2013).

As plantas desenvolveram, ao longo do período evolutivo, diferentes estratégias naturais para tolerar ou evitar condições de déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estas alterações incluem, entre outras, fechamento estomático, repressão do

crescimento celular e da fotossíntese e o aumento da respiração (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

Uma das respostas iniciais contra o déficit hídrico é a diminuição da condutância estomática, que reduz a evaporação através das folhas, diminuindo a perda de água e limitando a difusão de CO₂ para os cloroplastos (SIRICHANDRA et al., 2009). O fechamento estomático, o qual durante a seca limita a difusão de CO₂ para o interior do cloroplasto, dá-se em resposta ao aumento das concentrações de ácido abscísico (ABA) (LIMA et al., 2002). Este hormônio é produzido nas raízes e armazenado nos cloroplastos das folhas, de onde é liberado para o apoplasto (HARBORNE, 1976).

Mecanismos morfológicos de adaptação incluem o desenvolvimento de tricomas e pelos radiculares, redução da área foliar e abscisão foliar induzida em grande parte pela síntese de etileno, o que, segundo Isoda e Wang (2002), permite diminuir a transpiração, além da alteração da orientação das folhas, o que diminui o ângulo de incidência dos raios solares (TAIZ E ZEIGER, 2004). Outra adaptação de defesa ao déficit hídrico é a produção de uma cutícula espessa, que também atua na redução da transpiração cuticular (ISAACSON et al., 2009).

As plantas constantemente obtêm água e nutrientes através das raízes. Consequentemente, o sistema radicular exerce um importante papel em condições de escassez de água. Algumas plantas têm a capacidade de acentuar o crescimento das raízes no início do período de déficit hídrico para que elas absorvam maior quantidade de água do solo (HU; XIONG, 2014). O comprimento, peso, volume e densidade das raízes também estão relacionados à tolerância à seca em diversas culturas (PRICE et al., 2002).

As estratégias utilizadas pelas plantas em condições de déficit hídrico podem ser classificadas em quatro grupos distintos: evitamento, tolerância, escape e recuperação à seca. Dentre estes, evitamento e tolerância são os dois principais mecanismos conferidos pelas plantas (FANG; XIONG, 2015). O evitamento à seca é a estratégia de manter níveis altos de água, nos tecidos vegetais, durante períodos de estresse, seja pela maior eficiência na absorção de água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. A tolerância à seca permite a planta manter seu turgor e continuar seu metabolismo mesmo em condições de

baixo potencial hídrico. Tal estratégia é alcançada através da síntese de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997). O termo escape à seca refere-se a uma capacidade natural ou induzida de ajustar o crescimento e desenvolvimento da planta a fim de se evitar a estação ou os períodos de seca prolongada, levando ao crescimento e florescimento precoces, podendo acarretar na diminuição do número de sementes (FANG; XIONG, 2015; WITCOMBE et al., 2008). A recuperação à seca refere-se à capacidade da planta de retomar rapidamente seu crescimento e enchimento de grãos após a exposição a períodos severos de déficit hídrico, quando há a completa paralisação do crescimento, perda do turgor celular e desidratação foliar (LUO, 2010).

2.3.2. Respostas moleculares ao déficit hídrico

Nas últimas décadas, importantes avanços foram obtidos na compreensão de como estresses ambientais incluindo seca, alta salinidade, baixa temperatura e calor induzem a expressão de genes envolvidos em respostas de defesa celular a estas condições. Com relação à seca, os mecanismos moleculares de resposta começam pela percepção do sinal de estresse (XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002).

Para os vegetais superiores, os modelos de percepção de estresse estabelecidos sugerem várias hipóteses para o início da sinalização em nível molecular. A mais aceita propõe que alterações na conformação de membranas celulares devido à perda de turgidez provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais críticas embebidas nas membranas celulares e/ou também alterações na continuidade entre a parede e a membrana celulares. Todas essas alterações ativariam complexos enzimáticos os quais iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando à indução da expressão de várias categorias de genes de resposta à perda de água (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007; NEPOMUCENO et al., 2001; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002).

De modo geral, os produtos dos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, como o déficit hídrico, atuam como osmoprotetores, antioxidantes

celulares, “turnover” proteico, proteínas de sinalização de estresse e de regulação transcricional e podem ser divididos resumidamente em dois grandes grupos. No primeiro grupo, encontram-se genes funcionais que codificam para as proteínas chaperonas, proteínas LEA, osmotinas, proteínas anticongelantes, proteínas de ligação ao mRNA, assim como enzimas chaves na biossíntese de osmólitos, aquaporinas, transportadores de açúcar e prolina, enzimas de desintoxicação e várias proteases (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006). O segundo grupo é composto por genes reguladores que codificam para várias proteínas quinases, fosfatases e enzimas envolvidas no metabolismo fosfolipídico e também na biossíntese do ABA, além dos genes que codificam para fatores de transcrição como *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding* – Elemento de ligação de resposta à desidratação), *AREB* (*ABA Responsive Element Binding* - Elemento de ligação de resposta ao ABA), *MYC* (*Myelocytomatosis oncogene*), *MYB* (*Myeloblastosis oncogene*), *NAC* (*NAM, ATAF 1,2 e CUC*), *HB* entre outros. Estes genes reguladores atuam não somente na tolerância, mas também na regulação da expressão de genes e na transdução de sinais em resposta ao estresse (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

Na via de resposta ao déficit hídrico envolvida na síntese de osmoprotetores são sintetizados açúcares (trealose, sacarose, frutose), aminoácidos (prolina e triptofano) e compostos de amônio (poliaminas e glicil-betaína). Estes compostos, que se acumulam na maioria das plantas sob condições adversas, estão relacionados ao processo conhecido como ajustamento osmótico, que atua como mecanismo adaptativo reduzindo o potencial osmótico, aumentando a retenção de água na célula e retardando a senescência e a morte (CHAVES, 2004; TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001). A diminuição do potencial osmótico em resposta ao déficit hídrico pode levar ao aumento da concentração de solutos na célula de forma passiva ou ativa. Dentre ambas as formas, o acúmulo ativo de solutos é o único que pode ser considerado ajuste osmótico, pois é decorrente de pequenas alterações ocorridas no metabolismo das plantas, que mobilizam metabólitos para a síntese de compostos protetores vitais. O acúmulo líquido de osmólitos na célula ocorre para manter ou mesmo promover a absorção de água para o interior celular por osmose, mantendo a pressão de turgescência (CHAVES, 2004; PATAKAS et al., 2002).

Neste contexto, a família de oligossacarídeos de rafinose (“Raffinose family oligosaccharides” - RFOs), representada por compostos como a rafinose, estaquiose, e verbascose, possui função de tolerância ao déficit hídrico, pois também são capazes de regular o potencial osmótico, protegendo enzimas e membranas (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984; WANG et al., 2004). Os RFOs são comuns no reino vegetal, abundantes em sementes de uma grande variedade de espécies, e podem acumular-se em plantas submetidas a diferentes estresses ambientais como frio, calor e desidratação. A galactinol sintase é uma enzima chave na produção dos RFOs, sintetizando galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol (PANIKULANGARA, 2004; PATTANAGUL; MADORE, 1999).

2.4. Oligossacarídeos da família das rafinoses e a enzima galactinol sintase

Os carboidratos são o segundo grupo mais abundante presente nas sementes da soja (31%), indicando um importante valor nutricional e econômico para este grupo na indústria alimentícia. Estes carboidratos são representados por açúcares solúveis, tais como sacarose, estaquiose e rafinose, e por fibras insolúveis, que incluem principalmente hemicelulose, celulose e pectina. OS RFOs correspondem a aproximadamente 99% dos carboidratos solúveis presentes na semente de soja madura (HYMOWITZ et al., 1972; KUMAR et al., 2010).

Em plantas, a via metabólica de síntese dos RFOs já está bem estabelecida (Figura 1). A síntese destes oligossacarídeos depende da ação sequencial de uma série de galactosiltransferases e galactosilhidrolases. No primeiro passo, UDP-galactose e mio-inositol formam galactinol mais UDP, pela atividade da enzima galactinol sintase (GoIS, EC 2.4.1.123). No segundo passo, a enzima rafinose sintase (RFS, EC 2.4.1.82) transfere um resíduo de galactose do galactinol para a sacarose formando rafinose e mio-inositol. No terceiro passo, a enzima estaquiose sintase (STS, EC 2.4.1.67) transfere outro resíduo de galactose do galactinol para a rafinose, por meio de uma ligação α -(1-6), liberando os produtos estaquiose e mio-inositol (PETERBAUER; RICHTER, 2001).

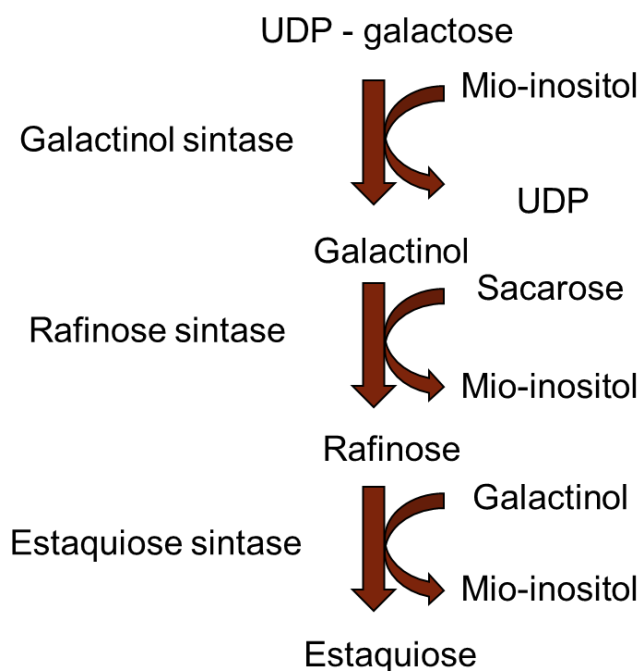


Figura 1. Representação esquemática da via de biossíntese dos RFOs. GoIS (Galactinol sintase), RFS (Rafinose sintase), STS (Estaquiose sintase). (Adaptado de Cao et al., 2013).

Os RFOs atuam como osmoprotetores, em condições de deficiência hídrica, principalmente por serem capazes de manter a integridade das membranas retendo, assim, água durante a dessecação (BENTSINK, 2000; ZUTHER et al., 2004). Adicionalmente, possuem ação antioxidante, impedindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) durante o déficit hídrico (NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA, 2008; PESHEV et al., 2013; VAN DEN ENDE; PESHEV; DE GARA, 2011; VAN DEN ENDE; VALLURU, 2008). Nishizawa et al. (2008) observaram que a transcrição do gene *GoIS1* e *GoIS2* é induzida por estresse causado por alta incidência de luz, por estresse térmico e que o tratamento com peróxido de hidrogênio ativa o fator HsfA2. Estes dados indicam que o acúmulo de galactinol e rafinose também está relacionado com a proteção das células vegetais aos danos advindos da produção de ROS causado pelos diferentes tipos de estresse, porém, estes mecanismos não foram ainda completamente elucidados (ELSAYED; RAFUDEEN; GOLLDACK, 2014; STEVENSON et al., 2000; XUE; CHEN; LI, 2007). Segundo Hare e Cress (1997), em condições de déficit hídrico ocorre uma perda do equilíbrio oxidativo/reduutivo em compartimentos como os

cloroplastos, o que acarreta no acúmulo de ROS devido ao declínio da atividade da organela.

Especificamente nos processos de tolerância a estresses abióticos em plantas, a evidência funcional para o papel dos RFOs foi obtida, inicialmente, a partir de plantas transgênicas de *Arabidopsis*. O gene *AtGolS2*, sob controle do promotor constitutivo CaMV35S, foi utilizado para geração de plantas GMs de *Arabidopsis* com o objetivo de avaliar a função e a expressão de genes ativados a partir da superexpressão do gene *GolS* em plantas submetidas a condições de déficit hídrico, frio e alta salinidade. Verificou-se que todas as plantas submetidas a estresses abióticos acumularam uma grande quantidade de galactinol e rafinose, mas não de estaquiose. Além disso, a galactinol e a rafinose não foram detectadas em plantas não estressadas, sugerindo que estas enzimas estão envolvidas na tolerância a seca, frio e salinidade. Adicionalmente, plantas que superexpressaram *GolS* mostraram redução na taxa de transpiração foliar, mecanismo que auxiliou na tolerância à seca (TAJI et al., 2002).

Um estudo conduzido para se avaliar o papel dos RFOs no processo de tolerância à baixa temperatura baseou-se no silenciamento do gene *Gal* em plantas de petúnia (*Petunia hybrida*). A degradação dos RFOs é feita pela ação da α -galactosidase (α -Gal; EC 3.2.1.22), que catalisa a clivagem hidrolítica da porção terminal da cadeia contendo os oligossacarídeos. Desta forma, pesquisadores inseriram o gene de tomate (*Lycopersicon esculentum*) *Lea-Gal*, sob controle do promotor FMV em diferentes plantas, com o objetivo de superexpressar e silenciar o gene α -Gal. Essas plantas foram submetidas a condições de baixas temperaturas e analisadas em relação à presença dos RFOs. Os resultados mostraram que o teor de RFOs nas plantas cujo gene *Lea-Gal* havia sido suprimido foi superior em relação aos níveis encontrados nas plantas não transformadas e naquelas cujo gene foi superexpresso. Sendo assim, o gene de α -Gal “down”-regulado em petúnias resultou no aumento da tolerância a baixas temperaturas, enquanto a superexpressão do gene causou diminuição do teor de RFOs, impossibilitando a tolerância ao frio (PENNYCOOKE, 2003).

Outra evidência do papel dos RFOs no processo de tolerância a estresses abióticos ocorreu no estudo de *Xerophyta viscosa*, que é uma planta conhecida por

ser extremamente resistente à dessecação, sendo capaz de suportar condições extremas e retomar seu metabolismo normal dentro de um curto período após o reestabelecimento hídrico. Sabe-se que existem aproximadamente 330 espécies de angiospermas com a capacidade de tolerar condições extremas de seca e todas elas acumulam sacarose nos períodos de estresse, mas o comportamento dos RFOs era até então desconhecido (PROCTOR; PENCE, 2002). Desta forma, a avaliação das plantas sob condições de déficit hídrico severo mostrou que na ausência de água os principais açúcares acumulados nas folhas de *X. viscosa* foram sacarose e RFOs e que esses níveis sofreram significativa redução após o reestabelecimento hídrico, provando que ambos desempenham papel fundamental na proteção dos tecidos foliares contra a dessecação. Este estudo também levantou a hipótese de que, nesta espécie, provavelmente a tolerância à dessecação seja decorrente de um processo multigênico, uma vez que nestas plantas houve o acúmulo tanto de sacarose quanto de rafinose, que são produzidos por vias distintas (PETERS et al., 2007).

A enzima principal da síntese dos RFOs, inositol-3- α -galactosil transferase, comumente conhecida como galactinol sintase (GoIS), representa uma classe relativamente pequena da família das glicosil transferases (SENGUPTA et al., 2012). A enzima GoIS é encontrada apenas em angiospermas, o que torna a síntese de galactinol e RFOs um evento metabólico altamente especializado em plantas superiores. Se por um lado a síntese de galactinol, em pequenas quantidades, é produzida em condições normais nas angiospermas, o aumento da síntese de rafinose nessas plantas acontece sob condições específicas, tais como durante a maturação associada à dessecação das sementes, na sinalização planta-patógeno, em danos causados por estresse bióticos e na resposta a diversos estresses abióticos (AMIARD, 2003; CHO et al., 2010; FOWLER, 2002; HARITATOS, 2000; PANIKULANGARA, 2004; PETERBAUER; RICHTER, 2001; SENGUPTA et al., 2012; TAJI et al., 2002; ZHAO et al., 2004a).

As plantas exibem um número variável de isoformas de *GoIS* com funções e locais de expressão específicos (FOWLER, 2002; PANIKULANGARA, 2004). Adicionalmente, *GoIS* compreende uma pequena família de genes em muitas espécies vegetais como melão, milho, arroz, café, soja, pepino e *Arabidopsis*

(SANTOS et al., 2011; SENGUPTA et al., 2012; STOLF-MOREIRA et al., 2010b; TAJI et al., 2002; VOLK; HARITATOS; TURGEON, 2003; ZHAO; MEELEY; DOWNIE, 2003; ZHAO et al., 2004b; ZUTHER et al., 2004).

A enzima *GoS* está ainda envolvida na regulação da partição do carbono, bem como também está diretamente implicada em muitos processos do desenvolvimento fisiológico tais como translocação no floema, proteção da semente durante a maturação e na resposta a estresses abióticos tais como frio, seca e salinidade em espécies como tomate, feijão e *Ajuga reptans*, entre outras (DOWNIE, 2003; LIU et al., 1998; PANIKULANGARA, 2004; SONG et al., 2003a). Entretanto, nem todos os genes *GoS* são *up* regulados durante situações de estresse (TAJI et al., 2002).

Embora evidências sobre a correlação entre a atividade da galactinol sintase e a concentração de RFOs presente nos órgãos das plantas tenham sido descritas, o aumento da expressão do gene *GoS* sugere que existam fatores alternativos que possam modular o acúmulo de RFOs (SANTOS et al., 2011). Além da atividade de *GoS*, a concentração inicial dos substratos *mio*-inositol e sacarose também pode controlar o acúmulo de RFOs em sementes (KARNER, 2004).

2.5. O déficit hídrico e a biotecnologia no desenvolvimento de plantas mais tolerantes à seca

Apesar dos números de produção positivos e crescentes, nos últimos anos as perdas na produtividade da soja têm sido recorrentes e expressivas devido ao aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca, decorrentes provavelmente das mudanças climáticas (JICA, 2011; EMBRAPA, 2014).

Assim, fatores bióticos e abióticos podem limitar a produtividade de diversas culturas, incluindo a soja. Dentre esses fatores, o déficit hídrico tem sido o responsável por limitar o crescimento e desenvolvimento da soja, afetando sua produtividade e distribuição espacial e, muitas vezes, a qualidade do grão, principalmente quando a falta de água ocorre nas fases de florescimento e enchimento de grãos, consideradas mais sensíveis à seca (BARBOSA, 2013; EMBRAPA, 2005). Cabe ressaltar que os problemas decorrentes do déficit hídrico

não são restritos a algumas áreas produtoras, ao contrário, a seca hoje vem sendo considerada um problema global, pois as áreas atingidas estão se expandindo e a expectativa futura é de que nas próximas décadas, aliado ao déficit hídrico, ocorram ainda aumentos significativos da temperatura média global, da concentração de gases na atmosfera, principalmente CO₂, acarretando mudanças climáticas em todo o planeta (NEPOMUCENO et al., 2001). Estimativas mostram que por volta de 2050, quando a população mundial somará cerca de 9,1 bilhões de pessoas, a temperatura global será em média 1,8°C maior que a atual, a concentração de CO₂ no ar será de 550 ppm (partes por milhão) e a concentração de O₃ será de 60 ppb (partes por bilhão). Neste cenário, a fisiologia das plantas será cada vez mais afetada, sem considerar outras diversas variáveis também relevantes, como a diminuição das precipitações pluviométricas. Segundo Pennisi (2008), o aumento da temperatura alterará o regime de chuvas, de evaporação da água e da transpiração das plantas. Ou seja, previsões científicas traçam um cenário futuro onde a população mundial terá aumentado significativamente, assim como a necessidade de se produzir mais para atender a demanda por alimentos.

Ainda neste panorama desfavorável, os pesquisadores terão que lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos que irão interferir diretamente na produtividade das culturas, em uma área de plantio já sofrida, diminuta e desgastada. Alguns dados mostram que o aumento de temperatura pode provocar, de um modo geral, diminuição de regiões brasileiras aptas ao cultivo dos grãos. Com exceção da cana-de-açúcar e da mandioca, todas as outras culturas analisadas - algodão, arroz, feijão, girassol, milho e soja - sofreriam queda nas áreas de baixo risco e, por consequência, no valor da produção. O aumento das temperaturas em decorrência do aquecimento global pode provocar perdas nas safras de grãos de R\$ 7,4 bilhões já em 2020 - número que pode subir para R\$ 14 bilhões em 2070 (ASSAD; PINTO, 2008).

Para minimizar e reduzir os prejuízos produtivos e financeiros decorrentes de longos períodos de déficit hídrico, várias estratégias têm sido utilizadas. Aliada às práticas convencionais de manejo e ao melhoramento genético, nos últimos anos a biotecnologia, através da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se mais uma ferramenta viável e acessível na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses

abióticos, como o déficit hídrico (PETHERICK, 2010). No âmbito científico, os estudos realizados têm concentrado esforços na obtenção de plantas que tolerem períodos mais prolongados de déficit hídrico não de forma paliativa, almejando somente a sobrevivência temporária da planta, mas principalmente buscando entender os mecanismos desencadeados em resposta ao estresse que auxiliem a planta a administrar o uso da água e a direcionar suas energias de forma sistêmica sob condições ambientais adversas. Molecularmente, para responder à seca, alguns genes são expressos e atuam desencadeando cascatas gênicas ou ainda pontualmente em vias metabólicas específicas de respostas que tentam controlar/minimizar os danos causados pelo déficit hídrico (BARBOSA, 2013).

Neste contexto, ferramentas biotecnológicas vêm sendo utilizadas para a inserção de genes exógenos que conferem tolerância a estresses abióticos como a seca em culturas importantes como a soja (QUEIROZ, 2014). Assim, desde 2004, foi firmada uma parceria entre a Embrapa Soja e o JIRCAS (“Japan International Research Center for Agriculture Science”) e uma das linhas de pesquisa tem como objetivo desenvolver plantas de soja GMs contendo construções gênicas com fatores de transcrição (FTs) responsáveis pela regulação simultânea de vários genes, entre outros genes identificados como responsivos à seca.

Além da manipulação, via metodologias de transformação de plantas, de fatores de transcrição responsáveis pela ativação de cascatas gênicas que conferem respostas induzidas à seca, o uso de genes chaves em vias metabólicas específicas envolvidas na defesa vegetal ao déficit hídrico também tem sido alvo de estudos recentes (HIMURO et al., 2014; PENNYCOOKE, 2003; TAJI, 2004; TAN et al., 2003).

A expressão estável do transgene durante as gerações subsequentes é o fator chave para o sucesso do cultivo das plantas geneticamente modificadas. A integração de uma cópia simples e intacta do cassete de expressão é desejável para que não haja a perda desses eventos, causado pelo silenciamento associado à complexa integração do transgene (CHAWLA et al., 2006; MENG; ZIV; LEMAUX, 2006; SCHUBERT, 2004).

Para caracterizar molecularmente os eventos obtidos, a avaliação conjunta de técnicas como a de RT-qPCR (Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa em Tempo Real) juntamente com a taxa de segregação das progênies deve ser

realizada para correta determinação de características como número de cópias, número de insertos e expressão constitutiva do transgene. A taxa de segregação pode ser estimada através da contagem das sementes positivas obtidas na progênie a partir da segunda geração.

2.5.1. Uso de genes de vias metabólicas seca-responsivas no desenvolvimento de PGMs (Plantas Geneticamente Modificadas) mais tolerantes ao déficit hídrico

Muitos FTs já foram identificados como seca-responsivos e vêm sendo utilizados no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, com grande potencial no uso para obtenção de variedades com aumento da tolerância às mudanças climáticas como seca e frio e à alta salinidade e congelamento (FUJITA et al., 2011). Estes FTs atuam como uma chave regulatória envolvida na expressão, na regulação gênica e na transdução de sinais em resposta ao estresse ambiental. Dentre os FTs já identificados como seca-responsivos e utilizados no desenvolvimento de plantas GMs estão os genes das famílias DREB e AREB. Estes FTs atuam, respectivamente, na via independente e dependente de ABA em resposta à seca nos vegetais. Pela ligação às regiões específicas DRE e ABRE (respectivamente) na região promotora de genes alvos, os FTs DREB e AREB ativam a transcrição de genes “downstream” responsáveis pelas respostas defensivas de proteção celular ao déficit hídrico (MIZOI et al., 2013; NAKASHIMA; ITO; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2009; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; WANG; YANG; YANG, 2011; XU et al., 2008).

A inserção do FT *AtDREB1A* sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A* aumentou com sucesso a tolerância à seca em *Arabidopsis* (Gilmour et al., 1998; Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998), tabaco (Kasuga et al., 2004), arroz (Dubouzet et al., 2003; Oh et al., 2005; Ito et al., 2006), milho (Pellegrineschi et al., 2004), trigo (Gao et al., 2009), amendoim (Bhatnagar-Mathur; Vadez; Sharma, 2008; Devi, 2011; Vadez et al., 2013) e soja (DE PAIVA ROLLA et al., 2014; LI et al., 2005; POLIZEL et al., 2011). Em soja, linhagens GMs DREB1A mostraram respostas mais favoráveis ao déficit hídrico relacionadas à maior expressão de genes de defesa

contra a dessecação. Fisiologicamente, as plantas GMs apresentaram alta taxa de sobrevivência após um severo período de deficiência hídrica e importantes respostas à privação de água como manutenção da fotossíntese e eficiência fotossintética (POLIZEL et al., 2011). Em condições de campo, os dados mostraram que, embora as plantas DREB1A não tenham superado a cultivar convencional BR 16 (seu “background” genético) em termos de rendimento, alguns componentes de produção como número de sementes, número de vagens com sementes e número total de vagens foram maiores na linhagem transgênica quando o déficit hídrico foi induzido no período vegetativo (ROLLA et al., 2014).

Além do gene DREB1A, outro fator de transcrição da família DREB, o gene DREB2A, vem sendo utilizado na obtenção de plantas mais tolerantes à seca, salinidade e calor (CHEN et al., 2007; QIN et al., 2007; SAKUMA, 2006; SAKUMA et al., 2006). Em *Arabidopsis*, os homólogos DREB2A e DREB2B são ativados em resposta à seca e salinidade. No entanto, trabalhos mostraram que DREB2A pode induzir a expressão de vários genes de resposta ao calor, estresse ao qual DREB1A não confere tolerância (QIN et al., 2007; SAKUMA et al., 2006). Trabalhos utilizando DREB2A CA (forma constitutivamente ativa - CA), sob controle do promotor constitutivo 35S ou estresse-induzido rd29A, e genes homólogos de DREB2A em *Arabidopsis*, milho e soja, indicaram que a tolerância não somente ao déficit hídrico mas também à alta salinidade e ao calor foram maiores em plantas GMs de *Arabidopsis* (Chen et al., 2007), sugerindo que DREB2A pode promover a indução da expressão de genes “downstream” de resposta à estes estresses abióticos em diferentes espécies vegetais (SAKUMA et al., 2006a, 2006b; SCHRAMM et al., 2008). Em soja, linhagens GMs rd29A:AtDREB2A transpiraram menos que a cultivar convencional BR 16 (“background”), sugerindo um mecanismo de conservação de água das plantas GMs quando em condições de boa disponibilidade hídrica (ENGELS et al., 2013).

Considerando-se os genes presentes na via de resposta à seca dependente de ABA, o FT AREB (*Abscisic acid responsive elemento binding protein*), do tipo bZIP (*Basic domain/leucine zipper* - zíper básico de leucina) e isolado de *Arabidopsis* é uma proteína de ligação ao elemento de resposta ao ABA ou ABF (ABRE – *binding factors*). Yoshida et al. (2010) demonstraram a superexpressão de

AREB1 em condições de déficit hídrico promovendo a tolerância à desidratação. Fujita et al. (2005) demonstraram que plantas transgênicas expressando a forma fosforilada de AREB1 induzem muitos genes ABA responsivos sem a aplicação de ABA exógeno. Especificamente em soja, construções contendo o gene AREB1 foram inseridas com sucesso. Para a construção *35S:AtAREB1AFL*, a análise da expressão gênica relativa mostrou que o transgene foi superexpresso em todas as linhagens GMs. Duas linhagens apresentaram melhoria na tolerância ao déficit hídrico, sobrevivendo a seis dias de irrigação suspensa, de modo que três dias após reidratação não apresentaram nenhum dano foliar. Além disso, a fotossíntese destas linhagens, em condições de déficit hídrico, foi significativamente maior que a da cultivar sensível à seca BR 16, seu “background” genético (BARBOSA, 2013).

Além disso, para outra construção gênica contendo o gene *AREB1*, *35S:AtAREB1AΔQT*, em condições de déficit hídrico, as plantas transformadas apresentaram maior taxa de sobrevivência (100%), melhor eficiência do uso da água e maior número de folhas que seu “background” genético, a cultivar BR 16. As plantas transgênicas apresentaram também maior condutância estomática sob condições bem irrigadas (CHEN et al., 1993).

Outro FT, NAC, já foi utilizado na obtenção de PGMs mais tolerantes aos estresses abióticos. Segundo Fujita; Fujita; Maruyama (2004), o gene seca-induzível *RD26* codifica um fator de transcrição NAC. Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando constitutivamente *RD26* mostraram-se hipersensíveis ao ABA, com a expressão de muitos genes ABA-induzidos em resposta à desidratação, à alta salinidade e ao tratamento com ABA exógeno. Em arroz, o gene *OsNAC6* foi induzido por ABA, frio, desidratação e salinidade (NAKASHIMA et al., 2007). Ainda nesta cultura, o gene *SNAC1* (*Stress responsive NAC1*) apresentou aumento da expressão sob condições de seca e alta salinidade (HU et al., 2006). Por sua vez, o gene *SNAC2* (*Stress responsive NAC2*) quando superexpresso levou à obtenção de plantas mais tolerantes ao frio e à salinidade (HU et al., 2008).

Além dos fatores de transcrição, genes de outras vias metabólicas de resposta ao déficit hídrico vem sendo utilizados no desenvolvimento de plantas mais tolerantes à seca. Assim, a manipulação de genes associados à produção de

osmoprotetores como os RFOs também tem sido utilizada para melhorar a tolerância das plantas cultivadas ao déficit hídrico (REGUERA; PELEG; BLUMWALD, 2012).

Diversos estudos identificaram a expressão do gene *Go/S* sob diferentes condições de estresses e em espécies vegetais diversas, inclusive de importância econômica tais como melão, milho, arroz, café e soja (SANTOS et al., 2011; SENGUPTA et al., 2012; STOLF-MOREIRA et al., 2010a; VOLK; HARITATOS; TURGEON, 2003; ZHAO et al., 2004a).

Em *Arabidopsis*, existem sete membros pertencentes à família de genes *Go/S*, mas apenas três deles são responsivos a estresses abióticos. *AtGo/S1* e *AtGo/S2* são induzidos por seca e alta salinidade, mas não por baixas temperaturas, enquanto *AtGo/S3* é induzido por baixas temperaturas, mas não por seca ou alta salinidade (TAJI et al., 2002). A prova experimental da função protetora dos RFOs veio de análises de plantas de *Arabidopsis* geneticamente modificadas superexpressando o gene *Go/S2*. Estas plantas, sob déficit hídrico, apresentaram aumento no nível de galactinol e rafinose endógenos. Além disso estas plantas apresentaram redução na taxa transpiratória, o que auxiliou na tolerância a seca. Tais resultados permitiram concluir que galactinol e rafinose podem atuar como osmoprotetores em condições de déficit hídrico (TAJI et al., 2002).

Ainda em *Arabidopsis*, estudos mostraram que a expressão dos genes *Go/S1*, *Go/S2* e *RS2* foi regulada pelos fatores de transcrição de choque térmico HsfA1a, HsfA1b e HsfA2 (BUSCH; WUNDERLICH; SCHÖFFL, 2004; NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA, 2008; PANIKULANGARA, 2004; SCHRAMM et al., 2006). Busch; et al (2005) realizaram um estudo onde plantas de *Arabidopsis* tiveram suas folhas coletadas e submetidas à temperatura de 37°C por 1h em solução de incubação para serem analisadas via microarranjo. No material, verificou-se que dos sete genes *Go/S* presentes no genoma de *Arabidopsis*, cinco não foram afetados pela alta temperatura. Desta forma, apenas os genes *AtGo/S1* e *AtGo/S2* foram induzidos, sendo que a expressão de *AtGo/S1* foi 22 vezes maior que a de *AtGo/S2*. Além dos genes *Go/S*, outros genes da rota galactinol/rafinose foram analisados e verificou-se que pelo menos um membro de cada família de genes que codificam para enzimas relacionadas à rota foi induzido pela alta temperatura e a maioria desses genes são regulados via HsfA1a/1b.

Em melão, verificou-se que o gene *CmGo/S* ativou o metabolismo dos RFOs em plantas sob déficit hídrico, sendo que a expressão desse gene ocorreu em folhas e sementes (VOLK; HARITATOS; TURGEON, 2003). Em milho, dois genes *Go/S* foram descritos, sendo que *ZmGo/S3* acumula-se durante o período de desenvolvimento da semente, enquanto *ZmGo/S2* é responsável pelo acúmulo de galactinol prevenindo a desidratação durante a germinação. No entanto, em estudos realizados em calos, não foi possível detectar o acúmulo de transcritos, mostrando que este gene não foi expresso em todos os tecidos (ZHAO et al., 2004b).

Em arroz, dois genes *OsGo/S* já foram descritos e ambos foram expressos sob condições de seca e salinidade, porém apenas um deles foi induzido sob baixas temperaturas. Quando não induzidos por condições adversas, os genes *Go/S* não apresentaram níveis de expressão detectáveis (SENGUPTA et al., 2012).

Em café, três genes *CaGo/S* foram avaliados sob condições de estresse. Transcritos de *CaGo/S1* foram acumulados em condições de déficit hídrico, salinidade e calor; *CaGo/S2* foi detectado em déficit hídrico severo causado e alta salinidade e *CaGo/S3* foi expresso sob déficit hídrico (SANTOS et al., 2011). Todos os *CaGo/S* foram detectados em tecidos foliares, mas não em outras partes da planta, assim como observado em milho (ZHAO et al., 2004b).

Em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico, Stolf-Moreira et al. (2010a) verificaram a expressão de *GmGo/S* em folhas, sugerindo que este gene estaria envolvido na resposta à seca. Em outro estudo, estes autores verificaram que *GmGo/S* apresentou o mesmo perfil de expressão de *GmDREB1A*, supondo que o gene pode ser regulado pelos fatores de transcrição DREB1 sob condições de deficiência hídrica (STOLF-MOREIRA et al., 2010b). Também em soja, sob déficit hídrico, Marcolino-Gomes et al. (2014) avaliaram as oscilações de expressão do gene *GmGo/S* ao longo de 24h e verificaram variações diurnas na expressão do gene, sendo que o pico de expressão ocorreu antes do amanhecer. Neste mesmo trabalho, os autores ainda observaram que este gene contém elementos de resposta ao ABA na sua região promotora.

Em um estudo recente, o gene *AtGo/S2* foi inserido em calos embriogênicos de *Brachypodium distachyon* via biobalística. A expressão do gene foi avaliada via RT-qPCR em plantas submetidas a condições de déficit hídrico e reidratação. As

plantas transformadas apresentaram melhor desempenho com relação ao teor de clorofila, à biomassa de raízes e à taxa de sobrevivência (HIMURO et al., 2014).

Com base nesses estudos, seria possível afirmar que, através da manipulação genética, a inserção do gene *AtGolS2* em soja geraria plantas GMs mais tolerantes, capazes de suportar favoravelmente condições de estresses abióticos como o déficit hídrico, fornecendo uma alternativa para manutenção da produtividade mesmo em condições desfavoráveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1. Cassete de expressão e cultivo de *Agrobacterium*

O cassete de expressão 35S:*AtGoS2* foi obtido através de um acordo entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e o Centro Internacional Japonês de Pesquisa de Ciências Agrícolas (JIRCAS – “Japan International Research Center for Agriculture Sciences”). Esta construção é composta pelo vetor binário pMDC123-IG Curtis; Grossniklaus (2003), e dois genes marcadores, o gene *bar* (*phosphinothricin acetyl transferase*), que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, usado como agente seletivo dos explantes transformados, e o gene *NPTII* (*Neomycin phosphotransferase*), responsável por conferir resistência ao antibiótico canamicina, que seleciona as colônias de *Agrobacterium* com o transgene inserido. O cassete de expressão está sob controle do promotor constitutivo *CaMv 35S* isolado do Vírus do Mosaico da Couve-flor (*Cauliflower mosaic virus*) e do terminador *Tnos* (Nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*), sítio de poliadenilação que sinaliza o fim da transcrição. O vetor pMDC123-IG foi ligado ao vetor pC3300J-35S (Cambia Enabling Innovation, 2012) contendo o cDNA do gene *GoS2* de *Arabidopsis thaliana*.

A estirpe de *Agrobacterium* utilizada foi a EHA 105 (Hood et al., 1993), considerada uma estirpe muito virulenta e que possui em sua estrutura o gene de resistência a rifampicina. A estirpe EHA 105 é derivada de EHA101 (Hood et al., 1986) e foi desenvolvida a partir da deleção de T-DNA nativo de EHA 101, substituído por um gene de resistência à canamicina.

O vetor contendo o gene *AtGoS2* foi inserido, via eletroporação, conforme descrito por Casali e Preston (2003) em células de *Agrobacterium*. Estas foram transferidas para o meio Yep (Gelvin; Schilperoort; Verma, 1989), composto por peptona (10 g L⁻¹), NaCl (5 g L⁻¹), extrato de levedura (5 g L⁻¹), pH 7,0, suplementado com canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹) para a seleção das bactérias transformadas. As colônias selecionadas foram então multiplicadas e posteriormente estocadas em glicerol. A partir do estoque, uma placa de Petri foi estriada e

armazenada em incubadora a 28°C por 24h para a multiplicação das células a serem utilizadas no processo de transformação.

O protocolo de transformação utilizado foi o descrito por Paz et al. (2006) e consistiu na utilização de nós cotiledonares de sementes de soja maduras. Visando melhorar o processo de infecção, o bisturi, instrumento utilizado no protocolo original para ocasionar o ferimento no tecido, foi substituído por uma micro escova de aço inoxidável, conforme descrito por Yamada et al. (2010).

Inicialmente, o pré-cultivo foi preparado a partir de uma colônia isolada de *Agrobacterium* contendo a construção 35S:AtGo/S2. As células foram incubadas em 10 mL de meio YEP suplementado com canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹) e mantidas em incubadora refrigerada com agitação orbital TE-421 – TECNAL, a 150 rpm, por 24h, à temperatura de 28°C. Após o crescimento das bactérias, 100 µL do pré-cultivo foram transferidos para um novo frasco contendo 100 mL de meio YEP suplementado com os antibióticos e incubado nas mesmas condições anteriormente descritas.

O cultivo de *Agrobacterium* (OD₆₀₀ 0,6-0,9) foi centrifugado a 5.000g por 10 min e ressuspenso em 40 mL de meio de co-cultivo, composto por 1/10X Gamborg B5 Basal Medium (Gamborg; Miller; Ojima, 1968), vitamina B5 1/10X, sacarose (30 g L⁻¹), MES (4,26 g L⁻¹), ágar (4 g L⁻¹), pH 5,4. O meio foi suplementado com ácido giberélico (GA₃) (0,25 mg L⁻¹), 6-Benzilaminopurina (BAP) (1,67 mg L⁻¹), Cisteína (400 mg L⁻¹) e Ditiotreitól (1 M), previamente esterilizados com membrana de filtro de 0,45µm (Millipore, USA) e adicionados ao meio após a autoclavagem.

3.1.2. Material vegetal e infecção dos explantes

A cultivar convencional de soja BRS 184 foi utilizada para o processo de transformação genética. Esta cultivar foi sugerida pela equipe do Programa de Melhoramento de Plantas da Embrapa Soja por se tratar de uma cultivar com alto potencial produtivo, boa aceitação no mercado e facilidade de cruzamento.

Em cada repetição do experimento de transformação foram utilizadas aproximadamente 100 sementes de soja, dispostas em placas de Petri e mantidas em dissecador para desinfecção com gás cloro por 16h. Após a exposição ao gás

cloro, as placas foram fechadas e acomodadas em uma câmara de fluxo laminar, onde permaneceram abertas por 30 min para remoção do excesso de gás. As sementes estéreis foram hidratadas durante 16h em placas contendo meio de germinação, composto por 1X Gamborg B5 Basal Medium (Gamborg; Miller; Ojima, 1968), Vitamina B5 1X, sacarose (30 g L^{-1}), MES ($0,64 \text{ g L}^{-1}$), phytaagar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$), pH 5,6. Após a hidratação, em cada semente foi realizado um corte horizontal seguido de um corte longitudinal ao longo do hilo para separação dos cotilédones e a retirada do tegumento, uma porção do embrião e os primórdios foliares. Em seguida, os explantes foram transferidos para o meio de co-cultivo contendo o cultivo de *Agrobacterium*, onde cada cotilédone foi riscado de 10 a 12 vezes com o auxílio de uma micro escova de aço inoxidável (Figura 2). Em seguida, doze explantes foram dispostos com a parte adaxial voltada para baixo em placa de Petri contendo meio de co-cultivo recoberto com papel de filtro estéril para evitar a proliferação da *Agrobacterium*, e mantidos por cinco dias em câmara climatizada, com fotoperíodo de 18h luz / 6h escuro, luminosidade de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e a 60% de umidade relativa.



Figura 2. Etapas para a infecção dos explantes. A) corte horizontal na semente; B) remoção da radícula; C) retirada do tegumento; D) corte longitudinal ao longo do hilo para separação dos cotilédones; E) retirada dos primórdios foliares; F) ferimento na região do nó cotiledonar.

3.1.3. Regeneração, seleção e identificação dos eventos

Após o período de co-cultivo, os explantes foram lavados em água destilada e autoclavada e transferidos para o meio de multibrotamento com a parte aérea em contato com o meio de cultura para induzir a formação de multibrotos. O meio de multibrotamento foi composto por 1X Gamborg B5 Basal Medium, Vitamina B5 1X, sacarose (30 g L^{-1}), MES ($0,64 \text{ g L}^{-1}$), phytaagar ($7,0 \text{ g L}^{-1}$), pH 5,6, suplementado com BAP ($1,67 \text{ mg L}^{-1}$) e meropene (25 mg L^{-1}) previamente filtro esterilizados e adicionados após a autoclavagem. Os explantes permaneceram no meio de multibrotamento por quinze dias, em câmara climatizada, com as mesmas condições descritas anteriormente, e posteriormente foram transferidos para o meio de multibrotamento suplementado com o agente seletivo glufosinato de amônio (3 mg L^{-1}).

Os explantes permaneceram no meio de multibrotamento com glufosinato por mais quinze dias e, então, foram cortados na base do cotilédone para exposição de novos tecidos e transferidos para o meio de alongamento, composto por MS 1X, Vitamina B5 1X, sacarose (30 g L^{-1}), MES ($0,64 \text{ g L}^{-1}$), phytaagar ($7,0 \text{ g L}^{-1}$), pH 5,6 e suplementado com GA_3 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), asparagina (50 mg L^{-1}), ácido piroglutâmico (50 mg L^{-1}), ácido indol acético ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), zeatina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), meropene (25 mg L^{-1}) e glufosinato de amônio (6 mg L^{-1}).

Novas transferências de meio de cultivo foram realizadas a cada quinze dias, podendo permanecer até oito semanas no meio de alongamento. A cada troca de meio de cultivo, um novo corte era realizado nos explantes até que os novos brotos atingissem um tamanho ideal para a transferência para o meio de enraizamento. Quando os brotos alcançaram aproximadamente 3 cm de comprimento, foram cortados e transferidos para magentas contendo meio de enraizamento, composto por MS modificado $\frac{1}{2}\text{X}$, Vitamina B5 1X, sacarose (20 g L^{-1}), MÊS ($0,64 \text{ g L}^{-1}$) e ágar (7 g L^{-1}), pH 5,6 e meropene (25 mg L^{-1}). Para indução da formação de raízes, os brotos recém cortados foram imersos em uma solução de ácido indolbutírico 1:100 (v/v) antes de serem inseridos no meio de enraizamento. Os explantes alongados permaneceram em câmara climatizada até o aparecimento de mais de duas raízes, quando as plântulas foram gentilmente removidas, lavadas em água para remover o

excesso de meio presente nas raízes e transferidas individualmente para copos plásticos de 180 mL preenchido com uma mistura de substrato:areia (1:1), com o substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2). As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento por pelo menos uma semana, para posteriormente serem transferidas para casa de vegetação e testadas via PCR convencional.

Amostras de folhas das plantas de soja transformadas foram coletadas para extração do DNA genômico, conforme o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1987). A confirmação dos eventos positivos foi feita via PCR convencional utilizando pares de “primers” específicos para o gene inserido (“forward” 5' ccc TCT AGA ATG GCA CCT GAGATCAATAC 3' e “reverse” 5'ccc GGA TCC CTA AGC TGC AGA TGG AGC TT3') que amplificam um fragmento de 1018 pb, correspondente a uma parte específica da região codante do gene alvo 35S:*AtGo/S2*.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL e composta por 5 µM de cada iniciador “Forward” e “Reverse”, 0,4 mM de dNTP's, 2 mM de cloreto de magnésio, 1U de TaqDNA polimerase e 50 ng µL⁻¹ de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo Veriti (*Applied Biosystems*) e a ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30s, 59°C por 30s e 72°C por 30s e finalizando com um ciclo de 72°C por 7 min. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% a 100 volts e visualizados em transluminador UV.

Após a identificação dos eventos positivos, as plantas negativas foram descartadas e as positivas mantidas em casa de vegetação para avanço de geração e multiplicação de sementes para experimentos futuros.

3.2. Análise da segregação dos transgenes na geração T₁

Para análise da segregação dos eventos gerados, folhas dos eventos positivos da geração T₁ e da geração T₂ foram coletadas e o DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo descrito por Doyle & Doyle. Em seguida, as amostras foram analisadas via PCR convencional para confirmação da presença do transgene utilizando os pares de iniciadores específicos para o gene *AtGo/S2*. O

teste do X^2 ($p \leq 0.05$) foi realizado para verificar se a segregação do gene *AtGoIS2* estava de acordo com a segregação mendeliana esperada.

3.3. Quantificação do número de cópias do transgene via qPCR

Plantas da geração T₁ e T₂ dos eventos positivos foram utilizadas na quantificação do número de cópias inseridas do transgene. Os programas *Vector NTI 11*, *ClustalX 2.1* e *CLC Sequence viewer* foram utilizados para realizar um alinhamento “parwise” das sequências de *Arabidopsis* e da soja para que não ocorresse nenhuma amplificação dos genes ortólogos de *AtGoIS2*. Para a reação de qPCR, os iniciadores para o gene alvo foram desenhados com auxílio do programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), todos os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1. Para a determinação do número de cópias do transgene por quantificação relativa, utilizou-se como calibrador o gene endógeno Lectina (*GmLec*, Acesso No. K00821), espécie-específico da soja e com apenas uma cópia no genoma haploide, ou duas cópias alélicas (homozigoto) (MEYER; CANDRIAN; LÜTHY, 1994).

Para ambos os genes, uma curva de eficiência de amplificação foi realizada utilizando-se uma série de diluições do DNA (5^{-6} , 5^{-5} , 5^{-4} , 5^{-3} e 5^{-2}). As reações de amplificações foram compostas pelos DNAs em cada diluição, 0,2 μ M de iniciadores F e R e 1x do tampão de reação do *kit Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen). As reações foram conduzidas em triplicatas biológicas e técnicas no termociclador em tempo real *Step One Plus (Applied Biosystems)*, nas seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 min, denaturação a 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Para calcular a eficiência da reação, aplicou-se a fórmula $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$ (PFAFFL, 2001).

Para determinação da quantificação do número de cópias, os valores de Ct do alvo *AtGoIS2* foram subtraídos do Ct da referência endógena lectina em cada amostra, resultando no valor de Δ Ct. O cálculo final para o número de cópias é 2 elevado à 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) e por este

motivo o valor de 2 variou conforme a somatória dos resultados obtidos nas reações de eficiência, que serão descritos a seguir.

Tabela 1. Sequências “Forward” e “Reverse” do iniciadores utilizados, tamanho dos produtos de amplificação do transgene *AtGo/S2* inserido e dos diferentes genes selecionados para análises de quantificação e expressão.

	Genes	iniciadores F e R	Amplicon
<i>AtGo/S2</i>	AT1G56600.1	CACCGTACCGGTCCACTCA TTCCAGCAAGGAAAGTCACGTA	65
<i>Rafinose 1</i>	Glyma03g137900	TCTTGGATTGGACAGAAGTG TACAGATCAGGTGAGGTGAT	101
<i>Rafinose 3</i>	Glyma19g004400	GTTGGTTTCTCTGAGGCATA GTCAGTGAAGTTTGCTCCTA	119
<i>LEA 2</i>	Glyma09g31740	GGTAGACAGCATTCTAGTGG TACCATAGACACCGGTAGTT	115
<i>LEA 6</i>	Glyma17g17860	AAAGGCACAGAGTGATGAAT CTTGATGACCTTGTGTACCA	131
<i>GmLec</i>	Acesso K00821	TCCCGAGTGGGTGAGGATAG CATGCGATTCCCAGGTATG	65
<i>Gmβ-actina</i>	Acesso GMU60500	GAGCTATGAATTGCCTGATGG CGTTTC ATGAATTCCAGTAGC	118

3.4. Análise da expressão constitutiva via RT-qPCR

A análise da expressão constitutiva do gene *AtGo/S2* foi realizada na geração T₁ dos eventos positivos apenas em condições controle (irrigadas), para se comprovar a expressão do transgene em boas condições hídricas. O aumento da expressão dos genes em situação controle tende a ocorrer pelo fato do gene alvo estar sob controle de um promotor constitutivo. O RNA total das amostras foi extraído com o reagente Trizol[®] de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então tratadas para eliminação de DNA genômico com o kit *DNAse I AmplificationGrade* (Invitrogen). Para confirmação da ausência de gDNA nas amostras, uma PCR convencional utilizando-se um conjunto de iniciadores que amplificam íntron do gene *β -actina* foi realizada e as amostras foram comparadas ao DNA genômico de BRS 184 (controle positivo e “background” genético). Desta forma, amostras contendo DNA genômico apresentam uma banda de 520pb, enquanto as amostras contendo somente o RNA não apresentam produto de amplificação.

Para a síntese do cDNA, foram utilizados cerca de 100 ng dos RNAs tratados e o kit *Superscript[®] III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen Life

Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

A curva de eficiência de amplificação para o gene normalizador (*Gmβ-actina*) (acesso GMU60500) e gene alvo (*AtGo/S2*) e as condições de amplificação utilizadas foram as mesmas já descritas no item 3.3. A determinação da expressão constitutiva via RT-qPCR foi realizada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O valor de Ct para ambos os genes alvo e normalizador foi detectado e o valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do controle endógeno, obtendo-se o ΔCt . Em seguida, o valor ΔCt foi subtraído do valor do ΔCt da amostra calibradora BRS 184 (correspondente ao “background” genético), resultando no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi substituído na fórmula do nível de expressão, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde número 2 corresponde à somatória das eficiências do gene alvo (100% = 1) e do controle endógeno (100% = 1), cujos valores foram calculados individualmente.

3.5. Análise da expressão gênica via RT-qPCR

O nível de expressão relativa do transgene *AtGo/S2*, e de alguns genes “upstream” e “downstream”, sob condições de déficit hídrico foi quantificado via RT-qPCR. Os genes alvos selecionados para análise de expressão foram *GmRS1*, *GmRS3*, *LEA2* e *LEA6*. Estes genes foram escolhidos com base em resultados de estudos prévios realizados em *Arabidopsis* por Taji et al. (2002) e em *A. reptans* por (HIMURO et al., 2014).

Para análise da expressão gênica, o RNA total das amostras foliares coletadas foi extraído e o cDNA sintetizado conforme descrito no item 3.4.

Para a análise via RT-qPCR, as sequências dos genes alvos foram pesquisadas no *Phytozome* e o desenho dos iniciadores foi realizado com auxílio do programa Primer-BLAST e *Vector NTI 11* na região codante de cada gene endógeno da soja. Para o gene *AtGo/S2*, o par de iniciadores foi desenhado no início da região codante e, para que não ocorresse nenhuma amplificação endógena na soja, um alinhamento múltiplo no banco de dados *Phytozome* foi realizado. A quantificação relativa do nível de expressão gênica foi realizada em triplicatas biológicas e técnicas (n=9).

A eficiência de amplificação dos iniciadores para os genes alvos, e para o normalizador, o gene *Gmβ-actina*, o qual apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos sob condições de déficit hídrico (STOLF-MOREIRA et al., 2011), foi determinada utilizando-se uma diluição seriada (5^{-6} , 5^{-5} , 5^{-4} , 5^{-3} e 5^{-2}) de um “bulk” de amostras. As reações foram compostas pelos cDNAs em cada diluição, 0,2 μM de iniciadores F e R e 1x do tampão de reação do *kit Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen). As reações foram conduzidas em termociclador 7900 HT (*Applied Biosystems*) com as mesmas condições de ciclagem descritas no item 3.3. Para determinação da quantificação da expressão gênica, os valores de Ct dos genes alvo *AtGoIS2*, *GmRS1*, *GmRS3*, *LEA2* e *LEA6* foram subtraídos do Ct da referência endógena *Gmβ-actina* em cada amostra, resultando no valor de ΔCt . Em seguida, o valor ΔCt foi subtraído do valor do ΔCt da amostra calibradora correspondente a mesma amostra em condição controle, resultando no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi substituído na fórmula do nível de expressão, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde número 2 corresponde à somatória das eficiências do gene alvo (100% = 1) e do controle endógeno (100% = 1), cujos valores foram calculados individualmente.

3.6. Parâmetros fisiológicos de linhagens GMs contendo a construção 35S:AtGoIS2 em condições de déficit hídrico

Para se avaliar os parâmetros fisiológicos induzidos pelo gene *AtGoIS2* em plantas de linhagens GMs 35S:AtGoIS2 sob déficit hídrico, foi conduzido experimento em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas. Nas parcelas, foram distribuídos os eventos transgênicos 2la1 e 2la4 e a cultivar convencional de soja BRS 184, correspondente ao “background” genético. Nas subparcelas, foram distribuídas as condições hídricas (déficit hídrico – DH; controle do déficit hídrico – CDH), com nove repetições.

Para implementação do experimento, todas as sementes da geração T₂ dos eventos selecionados e 50 sementes da cultivar convencional não transformada foram previamente tratadas com Vitavax® Thiram 200 SC (200 g L⁻¹) (Adapar) para manutenção de sua sanidade e em seguida dispostas em papel de germinação Germitest® umedecido com volume de água equivalente a duas vezes e meia a

massa do papel seco e mantidas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 100% de umidade relativa por 96h. Posteriormente, as plântulas foram imersas no inoculante microbiano Atmo[®] (*Bradyrhizobium japonicum* $5,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹) por 1 min e transferidas para vasos de 1L (15 cm diâmetro externo x 10 cm base x 11 cm altura) previamente esterilizados, aos quais foram inseridas duas folhas de papel filtro, adicionadas ao fundo do vaso para evitar a perda de substrato ao longo do período experimental e preenchidos com a mistura substrato:areia (1:1), com o substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), ambos (substrato e areia) previamente esterilizados. Cada vaso conteve uma única plântula e todas as plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura programada a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e registros de temperatura e umidade relativa a cada 5 min por meio de termohigrógrafo (Hobo U14-002, Onset[®]).

Os vasos foram irrigados diariamente com 100 mL de água, suficiente para saturar o substrato e a partir do estágio V₂, realizou-se fertilização com solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) uma vez por semana. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V₁, amostras de folhas foram coletadas para confirmação dos eventos via PCR convencional. Do total de plantas consideradas positivas para inserção do gene, parte foi destinada ao experimento de déficit hídrico e o restante das plantas foi mantida em casa de vegetação até o final do ciclo para avanço de geração. Ao atingirem o estágio V₄, as plantas do grupo DH foram submetidas ao déficit hídrico, o qual foi confirmado com base nos valores de condutância estomática (g_s) inferiores a $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto a condição controle correspondeu a valores de g_s superiores a $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (FLEXAS et al., 2004; SALINET, 2009) (. No dia anterior à indução do DH, todos os vasos foram saturados com 100 mL de água ao final da tarde para permitir a drenagem do excesso de água durante a noite. Na manhã seguinte, todos os vasos foram cobertos com sacos plásticos e o caule das plantas envolto com algodão a fim de se evitar a perda de água por evaporação pela região central do vaso. As plantas da condição controle permaneceram sendo irrigadas diariamente com volume de água suficiente para saturar o substrato, enquanto a irrigação foi suspensa naquelas do grupo DH, as quais foram monitoradas diariamente com relação aos valores de g_s . Quando as plantas da condição DH apresentaram valores de g_s inferiores a 200

mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (oito dias após a suspensão da irrigação), medidas de trocas gasosas – taxa fotossintética (*A*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), condutância estomática (*g_s*) - e de temperatura foliar foram realizadas no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido sentido ápice-base por meio de um analisador portátil de fotossíntese (LCpro-SD, ADC BioScientific). As medições foram feitas em casa de vegetação sempre a partir das 9h e com a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) estabelecida a 1000 μmol m⁻² s⁻¹. Após a medição das trocas gasosas, o mesmo trifólio foi coletado, embalado em papel alumínio, imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para as análises de expressão gênica.

3.6.1. Análise de parâmetros agronômicos

Após a obtenção dos dados relativos aos parâmetros fisiológicos e da coleta do material para análise de expressão gênica, as plantas foram transferidas para vasos de 8L contendo substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2) e mantidas sob irrigação automática até o final do ciclo para serem avaliadas com relação a alguns parâmetros agronômicos. Desta forma, ao final do ciclo, as seguintes variáveis foram avaliadas: número de vagens com sementes (NVCS), número de vagens sem sementes (NVSS), massa seca total de sementes (MSTS), número total de sementes (NTS), número de sementes por vagem (NSV), peso de mil sementes (P1000).

3.7. Análise da taxa de sobrevivência e transpiração diária

Neste experimento, sementes da geração T₂ das linhagens 2la1 e 2la4 e da cultivar convencional BRS 184 foram germinadas em papel de germinação e transferidas para vasos de 1L seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.5. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 8 blocos. Os vasos foram irrigados diariamente com 100 mL de água, suficiente para saturar o substrato, e realizou-se fertilização com solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) uma vez por semana. Quando as plantas atingiram o estágio V₁, estas foram

avaliadas via PCR convencional para confirmação dos eventos. Ao atingirem o estágio V_3 , todas as plantas foram submetidas ao déficit hídrico seguindo os mesmos procedimentos já descritos no item 3.5. As plantas permaneceram vinte dias sob déficit hídrico e, durante esse período, os vasos foram pesados diariamente para se obter a transpiração diária (g dia^{-1}) pela diferença na perda de água entre dias sucessivos. Quando 90% das plantas convencionais BRS 184 (“background” genético dos eventos transgênicos) apresentavam-se mortas, todas as plantas foram reidratadas a por oito dias, momento em que as plantas apresentaram evidente recuperação ao déficit hídrico. Após esse período, verificou-se a percentagem de plantas sobreviventes.

3.8. Análise de crescimento

Neste ensaio, o delineamento experimental utilizado foi o em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3x2 (materiais genéticos x condições hídricas), sendo dois eventos *AtGo/S2* (2Ia1 e 2Ia4 da geração T_2) e seu “background” genético (cultivar convencional de soja BRS 184), bem como plantas na condição controle (CDH) e sob déficit hídrico (DH), com 05 blocos.

O preparo das sementes, a instalação do experimento e o procedimento de indução do déficit hídrico foram os mesmos descritos no item 3.5. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V_1 , amostras de folhas foram coletadas para confirmação dos eventos via PCR convencional. No dia do ensacamento dos vasos, início do déficit hídrico, mediu-se a altura (ALT1) de todas as plantas, correspondente à distância entre o nó cotiledonar e o ápice caulinar. A partir de então, a irrigação foi suspensa nos vasos do grupo DH, enquanto as plantas da condição controle permaneceram irrigadas com volume de água, suficiente para saturar o substrato. Após oito dias de restrição hídrica, quando as plantas do grupo DH encontravam-se em déficit hídrico, comprovado pelos valores de condutância estomática (*gs*) conforme mencionado no item 3.5, realizou-se a segunda medida de altura das plantas (ALT2), bem como a contagem do número de nós e a medição da área foliar total, obtida por meio de um medidor modelo LI-COR 300 e definida como a soma das áreas de todas as lâminas foliares em cada planta. Em seguida, as

raízes foram lavadas e os diferentes tecidos (lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes) foram acondicionados separadamente em sacos de papel e secos em estufa a 60°C até a obtenção de peso constante, de modo que a massa seca dos diferentes tecidos foi obtida por meio de balança com sensibilidade de 0,1g. A massa seca total correspondeu à soma das massas secas dos diferentes tecidos em cada unidade amostral. O comprimento médio dos internós correspondeu à relação entre a altura (ALT2) e o número de nós. A partir de ambas as medições de altura (ALT1 e ALT2), obtiveram-se a taxa de crescimento relativo em altura, conforme a equação:

$$\text{TCRalt (\%)} = [((\text{ALT2} - \text{ALT1})/\text{ALT1}) * 100]$$

A umidade gravimétrica do substrato tanto das plantas controle (CDH) quanto daquelas sob déficit hídrico (DH) foi obtida a partir da equação $\text{UG (\%)} = 100 * [(\text{PL} + \text{MSU}) - (\text{PL} + \text{MSS})] / (\text{PL} + \text{MSS}) - \text{PL}$, onde: PL = peso da lata (g); MSU = massa de substrato úmido (g); MSS: massa de substrato seco (g), sendo esta última obtida após secagem do substrato a 110°C.

3.9. Análise estatística

Os resíduos apresentaram distribuição normal e atenderam aos demais pressupostos da análise de variância (ANOVA). Desta forma, os dados referentes a trocas gasosas, umidade gravimétrica do substrato, parâmetros de crescimento e parâmetros agrônômicos foram submetidos à ANOVA e às comparações múltiplas de médias realizadas pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de plantas de soja GMs contendo o gene *AtGo/S2*

Um total de 339 nós cotiledonares da cultivar de soja BRS 184 foram transformados com a construção *35S:AtGo/S2*. Das 339 plantas obtidas, 10 foram levadas a casa de vegetação para serem testadas para a presença do transgene via PCR convencional utilizando-se iniciadores específicos para a construção *AtGo/S2*. A variação entre o número de amostras transformadas e o número de amostras testadas é consequência da dificuldade de regeneração de plantas de soja em cultura de tecidos, dificultando a obtenção de eventos contendo o transgene e também devido ao método utilizado para condução do experimento, onde apenas as plantas sobreviventes ao processo de aclimação e transferência para a casa de vegetação foram avaliadas. Cinco plantas foram identificadas como positivas para a construção gênica *35S:AtGo/S2*. Após selecionadas, estas foram mantidas em casa de vegetação para multiplicação de sementes e avanço de gerações (Figura 3).



Figura 3. A) Planta T₀ crescendo em casa de vegetação para avanço de gerações; B) Bancada contendo plantas da geração T₁ em casa de vegetação.

A eficiência de transformação foi calculada de acordo com Rech; Vianna; Aragão (2008), onde a mesma é dada pelo número total de plantas transgênicas férteis dividido pelo número total de explantes transformados. Assim, uma eficiência de 1,47% (cinco eventos positivos/339 amostras transformadas) foi obtida.

De forma geral, a maioria dos estudos com *Agrobacterium* feitos em soja usam o mesmo protocolo descrito por Hinchee et al. (1988), porém com algumas modificações, como é o caso dos trabalhos realizados por Paz et al. (2004, 2006), Sato et al. (2007) e Yamada et al. (2010) que serão descritos a seguir. Paz et al.,

(2004) utilizando nós cotiledonares de 12 diferentes cultivares de soja transformadas com a estirpe EHA 101 de *Agrobacterium*, obteve uma eficiência que variou de 2% a 6,3%, sugerindo que a cultivar utilizada influencia diretamente na taxa de eficiência devido a susceptibilidade a infecção, assim como a maior capacidade de regeneração de cada genótipo. Sato et al. (2007) utilizou cinco diferentes cultivares japonesas que foram infectadas com a estirpe EHA 105 e comparadas com a cultivar utilizada no trabalho de Paz et al. (2004). A taxa de transformação obtida no trabalho de Sato et al. (2007) foi de 1%, consideravelmente inferior àquela obtida por Paz et al. (2004). Neste contexto, Yamada et al. (2010) com o objetivo de aumentar a taxa de eficiência de transformação na cultivar Kariyutaka, utilizou a estirpe EHA 105 juntamente com uma escova de aço no processo de injúria dos explantes obtendo assim uma taxa de eficiência de 4,4%. Assim, pode-se afirmar que o sucesso na taxa de transformação depende de diversos fatores, tais como a estirpe de *Agrobacterium* (Tie et al., 2012), a cultivar utilizada e o tecido escolhido para transformação (Chen; Dubnau, 2004), além das condições de regeneração do explante que dificultam o sucesso na obtenção de um grande número de eventos (LEE; JEON; KIM, 2002; ZUO et al., 2002).

4.2. Quantificação do transgene e taxa de segregação dos eventos

Para a análise da segregação dos eventos GMs gerados no presente estudo, sementes provenientes da geração T₀ foram semeadas em casa de vegetação e o DNA genômico foi extraído e analisado via PCR convencional para confirmação da presença do inserto nas gerações subsequentes.

Dos cinco eventos positivos obtidos em T₀, quatro (2la1, 2la2, 2la3, 2la4) passaram o gene *AtGo/S2* para a geração seguinte T₁ (Figura 4), e destes, apenas dois (2la1 e 2la4) passaram o gene para a geração T₂.

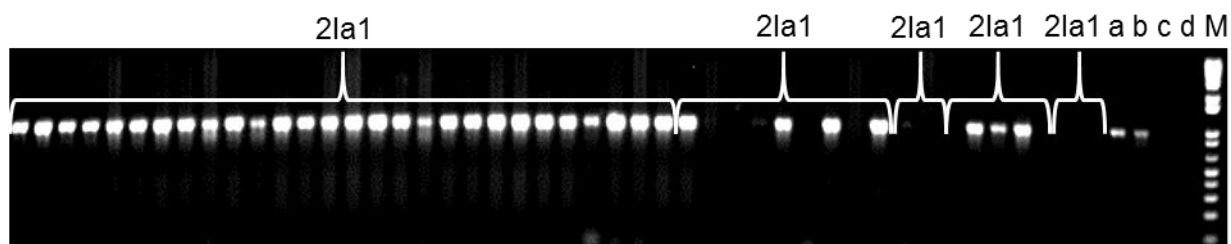


Figura 4. PCR convencional realizado com as plantas da geração T_1 provenientes das plantas 2la1, 2la2, 2la3, 2la4 e 2la9 da geração T_0 . M: Marcador molecular 1Kb Plus; a e b: controles positivos com construções de *AtGo/S2*; c e d: controles negativos, BRS 184 e branco, respectivamente.

O número de plantas obtidas na geração T_1 foi correspondente ao número de sementes T_1 oriundas das plantas T_0 . Por sua vez, o número de plantas obtidas na geração T_2 foi de 28 plantas no evento 2la1 e quatro plantas no evento 2la4. Para análise de segregação dos transgenes, todas as sementes T_3 , provenientes das plantas T_2 , foram agrupadas e o teste foi aplicado com base no montante final de sementes. Assim, os resultados mostraram que os eventos 2la2, 2la3 e 2la4 da geração T_1 e 2la1-8 e 2la4-11 da geração T_2 apresentaram o padrão de segregação mendeliana (Tabela 2).

Tabela 2. Proporção da segregação do gene *AtGo/S2* nas gerações T_1 e T_2 dos eventos GMs obtidos com a construção *35S:AtGo/S2*.

T_1	Positivas	Negativas	Total	FE	FO	FO-FE	FO-FE ²	Segregação	X ²	P (%)
2la1	28	0	28	21	28	7	49	-	2,333333	NS
2la2	4	5	9	6,75	4	-2,75	7,5625	~3:1	1,12037	NS
2la3	1	1	2	1,5	1	-0,5	0,25	~3:1	0,666667	NS
2la4	3	2	5	3,75	3	-0,75	0,5625	~3:1	0,416667	NS
T_2	Positivas	Negativas	Total	FE	FO	FO-FE	FO-FE ²	Segregação	X ²	P (%)
2la1-8	169	102	271	203,25	169	-34,25	1173,063	~2:1	5,771525	S
2la4-11	104	51	155	116,25	104	-12,25	150,0625	3:1	1,29086	NS

Legenda: FO= Frequência observada; Fe= Frequência esperada; X²= FO-FE/FE; NS= Não significativo/ S= Significativo

Para análise do número de cópias, três plantas de cada evento e de cada geração foram selecionadas com base no total de sementes produzidas por planta. Na Tabela 3, são apresentados os resultados da quantificação do número de cópias do transgene em cada evento obtido nas gerações T_1 e T_2 .

Tabela 3. Número de cópias (quantidade de transgene) obtidas de acordo com o método $2^{-\Delta Ct}$ via qPCR para três linhas de dois eventos transgênicos de soja (2la1 e 2la4) em geração T₁ e em geração T₂ contendo a construção 35S:AtGo/S2.

Eventos T ₁	Transgenes	Número de cópias	Eventos T ₂	Transgenes	Número de cópias
2la1-20	68	>10	2la1-8-19	4	2 - 4
2la1-21	74	>10	2la1-8-20	24	>10
2la1-35	34	>10	2la1-8-55	34	>10
2la4-10	4	2 - 4	2la4-11-10	4	2 - 4
2la4-11	6	3 - 6	2la4-11-11	4	2 - 4
2la4-12	38	>10	2la4-12-12	12	6 - 8

As plantas descendentes do evento T₀ 2la1 apresentaram de forma geral um grande número de cópias. O evento 2la1-20 apresentou 68 vezes mais a quantidade de transgenes que o calibrador endógeno lectina, sendo considerada uma planta com mais de dez cópias. Valor semelhante foi observado para o evento 2la1-21, que mostrou 37 vezes mais a quantidade de transgenes que o calibrador. Por sua vez, o evento 2la1-35 apresentou 17 vezes mais a quantidade de transgene. O padrão do alto número de cópias repetiu-se na geração T₂, exceto pelo evento 2la1-8-19, onde foi encontrada quantidade de transgenes duas vezes maior que a do calibrador.

O complexo rearranjo dos genes causado pela inserção do transgene no genoma das plantas T₀ e o grande número de cópias observado nessas plantas, não pode ser relacionado à taxa de segregação do evento 2la1, onde na geração T₁ todas as plantas foram consideradas positivas e na geração T₂ a taxa de segregação foi de 2:1 (Tabela 2). Sabe-se que, normalmente, no processo de transformação via *Agrobacterium* um baixo número de cópias do transgene são inseridas (Kohli et al., 2003; Olhoff; Flagel; Somers, 2004; Oltmanns et al., 2010). No entanto, segundo Song et al. (2003) o processo de integração do transgene sofre influência direta da estirpe de *Agrobacterium* e do gene exógeno utilizado. Diferentes condições experimentais podem levar a uma complexa integração desses transgenes no genoma, como observado por Wu et al. (2014) na avaliação de embriões de sorgo transformados com as estirpes LBA4404 e AGL1 de *Agrobacterium* utilizando cinco diferentes cassetes de expressão. Neste trabalho 35% dos eventos obtidos

apresentaram a inserção de múltiplas cópias no genoma e interessante a segregação mendeliana ocorreu em 66,7% das plantas. A segregação mendeliana também foi observada por Vain et al. (2002) em plantas de arroz transformadas via biobalística contendo 34 cópias de *uidA*, destes, apenas 7% apresentaram expressão estável na geração T₁. Segundo Ahuja e Fladung, (2014) e Pawlowski e Somers (1996) apesar de muitas vezes múltiplas cópias do transgene serem integradas no genoma, estas geralmente co-segregam como um locus transgênico. Ou seja, eles geralmente se integram em loci muito próximos ou no mesmo locus (Pawlowski & Somers, 1996).

O evento 2la4-10, da geração T₁, foi caracterizado com um baixo número de cópias, duas vezes a mais que o calibrador endógeno lectina, de acordo com o resultado obtido via qPCR. O evento 2la4-11 apresentou de três a seis cópias na geração T₁ e de duas a quatro cópias na geração T₂, número considerado baixo em comparação às outras amostras. A análise da segregação na geração T₂ revelou uma proporção de 3:1 para o transgene, indicando que este segregou de acordo com o padrão mendeliano, provavelmente sendo integrado no mesmo locus gênicos e comportando-se como um gene dominante. Por sua vez, a quantificação do número de cópias no evento 2la4-12 foi de difícil interpretação, uma vez que apresentou grande número de cópias tanto na geração T₁ quanto na geração T₂.

A quantificação do número de cópias via q-PCR utilizando o intercalante *SYBR Green* para o cálculo do número de cópias vem sendo utilizado como alternativa ao uso da técnica de “Southern blotting” para a realização de uma verificação inicial e eficiente dos eventos obtidos uma vez que necessita de pequenas quantidades de material biológico, além de ser um protocolo eficiente e rápido (ZHANG et al., 2015). A técnica foi validada em experimentos, tais como conduzidos com *Lesquerella fendleri* (Chen e Lin, 2010), cana de açúcar (Casu; Selivanova; Perroux, 2012) e trigo (Mieog; Howitt; Ral, 2013) onde em cada um destes estudos a quantificação do número de cópias inseridas de diferentes transgenes foi analisada, ilustrando a eficiência da metodologia.

4.3. Quantificação da expressão do gene *AtGoIS2* em plantas da geração T₁

Na reação de eficiência de amplificação, os iniciadores para *AtGoIS2* e *Gmβ-actina* apresentaram valores próximos, 93% e 98% respectivamente (Tabela 4). Não ocorreu a formação de dímeros de iniciadores ou amplificação de produtos inespecíficos.

Tabela 4. Taxas de eficiência dos iniciadores do transgene *AtGoIS2* inserido e dos diferentes genes selecionados para análises de quantificação e expressão.

	Genes	Taxa de eficiência
<i>AtGoIS2</i>	AT1G56600.1	93%
<i>Rafinose 1</i>	Glyma03g137900	95%
<i>Rafinose 3</i>	Glyma19g004400	92%
<i>LEA 2</i>	Glyma09g31740	97%
<i>LEA 6</i>	Glyma17g17860	90%
<i>GmLec</i>	Acesso K00821	96%
<i>Gmβ-actina</i>	Acesso GMU60500	98%

Todas as plantas da geração T₁ (2la1-20, 2la1-21, 2la1-35, 2la4-10, 2la4-11, 2la4-12) utilizadas na análise do número de cópias tiveram seu DNA extraído para análise da expressão constitutiva. No entanto, o material das plantas 2la1-20 e 2la4-10 não apresentou bons resultados nas análises e por este motivo precisou ser descartado. Os resultados mostraram que a planta 2la4-12 foi a que apresentou a maior expressão entre os materiais analisados, seguida pela planta 2la4-11, diferentemente das plantas do evento 2la1, onde todas apresentaram baixa ou nenhuma expressão, como foi o caso da planta 2la1-35 (Figura 5).

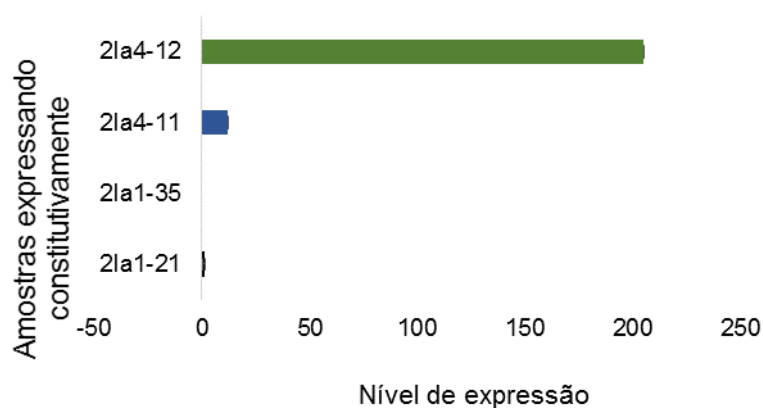


Figura 5. Comparação da expressão gênica relativa do transgene *AtGo/S2* na geração T₁ de quatro eventos obtidos em relação ao calibrador (BRS 184), sem indução de estresse. A expressão do transgene foi normalizada com o gene *Gmβ-actina* e calibrada com a cultivar convencional BRS 184, correspondente ao “background” genético.

A baixa expressão gênica identificada nas plantas do evento 2la1 está possivelmente associada ao grande número de cópias identificados neste evento (Tabela 3), introduzidos durante processo de infecção. Devido ao alto número de cópias e possíveis desarranjos no genoma, essas plantas, provavelmente, tiveram sua expressão silenciada, como será discutido adiante.

4.4. Quantificação da expressão do transgene *AtGo/S2* em plantas de soja submetidas a déficit hídrico

Com base nos resultados de taxa de segregação e produção de sementes na geração T₁, três eventos da geração T₂ (2la1-8, 2la2-34 e 2la4-11) foram selecionados para avaliar o efeito da inserção do gene *AtGo/S2* no genoma da soja, sob condições de déficit hídrico. No entanto, o evento 2la2-34, não apresentou descendência positiva para o gene *AtGo/S2*, sendo portanto, descartado das futuras análises. Nas avaliações subsequentes as plantas 2la1-8 e 2la4-11 da geração T₂ serão denominadas 2la1 e 2la4.

Desta forma, sob déficit hídrico, observou-se no evento 2la4 um aumento da expressão do gene, enquanto o inverso foi observado no evento 2la1. A expressão de *AtGo/S2* sob déficit hídrico foi 1x mais alta no evento 2la4, quando comparada à

condição controle e a cultivar convencional BRS 184, comprovando a indução do gene (Figura 6).

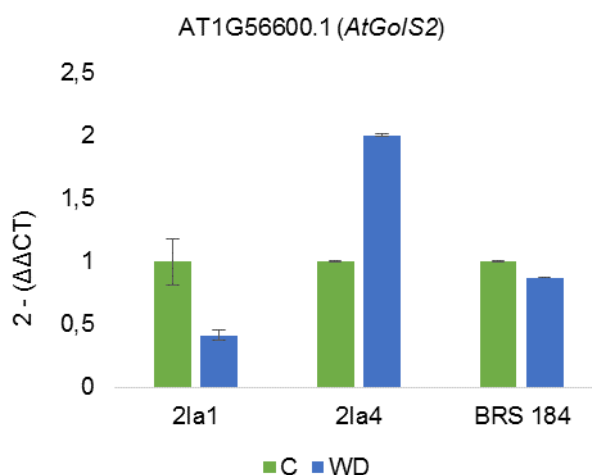


Figura 6. Nível de expressão do gene *AtGo/S2* na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle (CDH) e sob déficit hídrico (DH). A expressão do transgene foi normalizada com o gene *Gmβ-actina* e calibrada com a mesma amostra na condição controle (sem indução de estresse). Valores representam médias ± erro padrão; n = 9.

Neste contexto, para verificar as possíveis alterações decorrentes da introdução do gene *AtGo/S2* na biossíntese dos RFOs alguns genes da rafinose foram analisados e verificou-se que o gene da rafinose 1 (*GmRS1*-Glyma03g137900) apresentou no evento 2la4, em condições de déficit hídrico, uma expressão 1,5x maior quando comparado a cultivar BRS 184 sob estresse (Figura 7A). Por sua vez, o gene da rafinose 3 (*GmRS3* – Glyma19g004400), sob déficit hídrico mostrou-se aproximadamente 4,5x mais expresso, no evento 2la4, quando comparado com a cultivar BRS 184 em condições de estresse (Figura 7B).

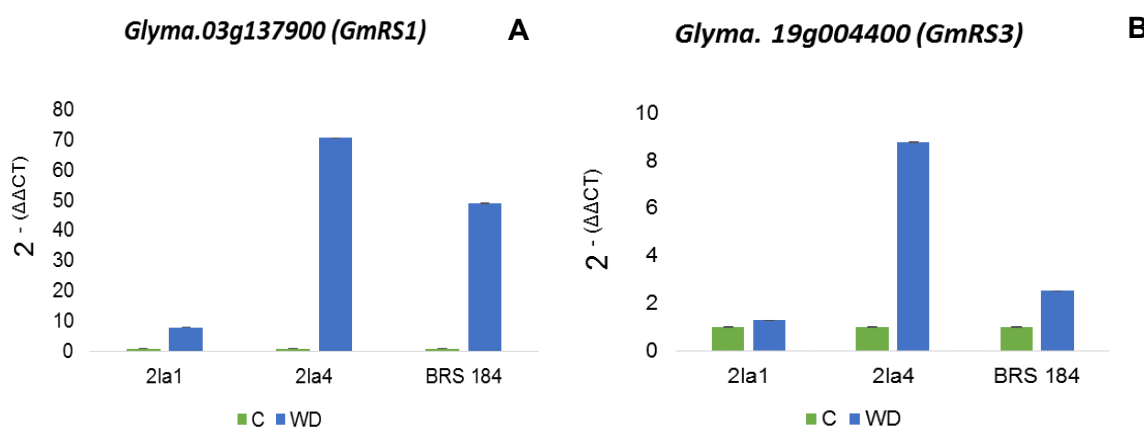


Figura 7. Nível de expressão do gene *GmRS1* (A) e *GmRS3* (B) na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle (CDH) e sob déficit hídrico (DH). A expressão do transgene foi normalizada com o gene *Gmβ-actina* e calibrada com a mesma amostra na condição controle (sem indução de estresse). Valores representam médias \pm erro padrão; n= 9.

Assim, notou-se nas plantas do evento 2la4 um aumento no acúmulo de transcritos de galactinol e rafinose. Estes carboidratos podem atuar como osmoprotetores resultando numa maior tolerância a estresses abióticos devido as alterações decorrentes do processo conhecido como ajustamento osmótico (CHAVES, 2004; TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001). A importância do acúmulo de transcritos de galactinol e rafinose, em decorrência da alteração no metabolismo de carboidratos em condições de estresses abióticos foi previamente descrito por Taji et al. (2002) em plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *AtGolS2* sob déficit hídrico. Neste trabalho Taji et al. (2002) observou um aumento tanto de galactinol quanto de rafinose nas plantas transformadas, indicando que estes açúcares teriam papel fundamental na tolerância à seca provavelmente atuando como osmoprotetores. O acúmulo de carboidratos em condições abióticas adversas também foi observado por Peters et al. (2007) que identificaram um gene relacionado a galactinol sintase, denominado *XvGolS*, em uma biblioteca de cDNA construída a partir de folhas de *Xerophyta viscosa* e verificaram que em plantas sob déficit hídrico com índice abaixo de 5% de conteúdo relativo de água - RWC (*Relative Water Content*), a sacarose e a rafinose foram os carboidratos predominantes. O aumento dos carboidratos, nos órgãos vegetais, em condições de estresse hídrico pode ser consequência da redução substancial da expansão dos órgãos, que levaria a limitação do consumo de carboidratos pelos drenos (LAWLOR;

CORNIC, 2002) (LAWLOR; CORNIC, 2002). Desta forma, tal acúmulo de carboidratos pode representar um mecanismo de adaptação vegetal a condição hídrica desfavorável, uma vez que estes podem atuar no ajustamento osmótico aumentando a retenção de água na célula e retardando a senescência e morte (QUICK et al., 1989) (QUICK et al., 1989). Adicionalmente, a associação desses oligossacarídeos com bactérias bifidogênicas pode resultar em benefícios fisiológicos, tais como atuar como fibra dietética, participar na atividade anticarcinogênica e reduzir os níveis séricos de lipídeos (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; GIBSON et al., 2004; MARTEAU P.; BOUTRON-RUAULT, 2002). O comportamento resultante da alteração no metabolismo de carboidratos das plantas 2la4 sob déficit hídrico foi avaliado em análises fisiológicas, em casa de vegetação, que serão descritas e melhor discutidas posteriormente.

Os genes *LEA2* e *LEA6*, importantes na resposta ao déficit hídrico também foram analisados. No evento 2la4, sob déficit hídrico, o gene *LEA2* (*Glyma09g31740*) apresentou uma expressão 1,2x mais alta quando comparado a cultivar BRS 184 sob estresse. O mesmo padrão de expressão também pôde ser observado em relação ao gene *LEA6* (*Glyma17g17860*), onde o evento 2la4 sob déficit hídrico mostrou-se 1,14x mais expresso quando comparado a cultivar BRS 184 sob déficit hídrico (Figura 8).

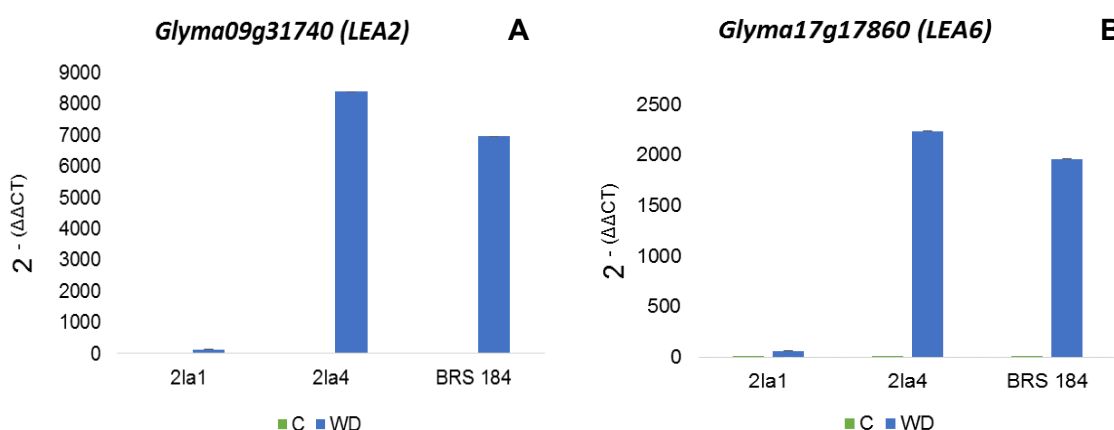


Figura 8. Nível de expressão dos genes *LEA2* (A) e *LEA6* (B) na cultivar BRS 184 e nos eventos GMs 2la1 e 2la4 na condição controle (CDH) e sob déficit hídrico (DH). A expressão do transgene foi normalizada com o gene *Gmβ-actina* e calibrada com a mesma amostra na condição controle (sem indução de estresse). Valores representam médias ± erro padrão; n= 9.

Além do papel que os RFOs desempenham na tolerância à seca, é possível que a interação entre as proteínas LEA e os RFOs, sugerida por Liu et al. (2010) e Wolkers et al. (2001) tenha possibilitado, no presente estudo, um aumento da capacidade das plantas 2la4 de sobreviverem e se recuperarem após o déficit hídrico severo. Wolkers et al. (2001), avaliaram a capacidade de carboidratos como sacarose e trealose e das proteínas LEA de atuarem conjuntamente através da formação de estruturas vítreas que se ligam por meio de ligações de hidrogênio, com o objetivo de minimizar os danos causados por estresses abióticos. Para tanto, os pesquisadores utilizaram a técnica de espectroscopia de infravermelho no pólen de *Typha latifolia* e puderam concluir que a formação dessas estruturas é capaz de proteger as células vegetais em condições abióticas extremas, possibilitando um longo período de estabilidade contra a seca em organismos tolerantes. Essa rede formada pelos carboidratos e pelas LEAs possibilita maior estabilidade das estruturas celulares servindo como âncoras em uma rede molecular para proporcionar estabilidade às estruturas macromoleculares e celulares (WOLKERS et al., 2001). Na matriz citoplasmática, esse estado vítreo teria a função de inibir a fusão das membranas celulares (Crowe et al., 1997; Sun et al., 1996), impedir a desnaturação das proteínas (CROWE et al., 2011) e limitar a difusão dos radicais livres (AMARA et al., 2013; BATTAGLIA; COVARRUBIAS, 2013; LIU et al., 2010). Embora a sacarose e trealose tenham sido utilizados no trabalho de Wolkers et al. (2001) os pesquisadores relataram que qualquer carboidrato solúvel poderia ter a característica de formação de estruturas vítreas para a proteção celular.

No presente estudo, com base nas análises de RT-qPCR das plantas do evento 2la1 sob déficit hídrico, não foi detectada expressão absoluta do gene *AtGo/S2* (Figura 6), enquanto para os demais genes avaliados a expressão mostrou-se bastante baixa (Figura 7 e Figura 8). Estes dados sugerem um possível mecanismo de silenciamento gênico. Barbosa et al., (2013) trabalhou com plantas GMs de soja com a construção pBI35S-AREB1 transformadas via biobalística e também observou plantas silenciadas devido ao grande número de cópias inseridas em um evento GM, aproximadamente 55, na geração T₀.

Para confirmar a ocorrência do silenciamento gênico no evento 2la1, outros experimentos e análises das gerações seguintes devem ser realizados para

determinar qual mecanismo de silenciamento SGPT (silenciamento gênico pós-transcricional) ou SGT (silenciamento gênico transcricional) estaria ocorrendo nessas plantas. O SGT estaria relacionado a metilações meioticamente herdáveis na região do promotor do transgene induzidas pelo pareamento de regiões homólogas de DNA ou ainda DNA-RNA (KOOTER; MATZKE; MEYER, 1999). Já no SGPT a metilação dentro da região codificante do transgene levaria a uma prematura interrupção de sua transcrição, resultando na síntese de um RNA aberrante (abRNA) (WASSENEGGER; PÉLISSIER, 1998). Após a determinação do processo ocorrido, estudos comparativos podem ser realizados para se verificar as consequências desse silenciamento.

4.5. Medidas de trocas gasosas e umidade gravimétrica do substrato

Com relação às medidas de trocas gasosas e à umidade gravimétrica do substrato (Figura 9), não se detectou interação significativa entre materiais genéticos e condições hídricas. Porém, menores valores foram observados para todas as plantas sob déficit hídrico, independentemente do material genético avaliado, exceto com relação à concentração intercelular de CO₂. Por sua vez, com exceção da umidade gravimétrica, sob déficit hídrico maiores valores foram observados para as plantas 2la4 quando comparados aos demais materiais genéticos.

A média dos valores de g_s observados nas plantas 2la4 em condições de baixa disponibilidade hídrica não são compatíveis com o padrão correspondente a plantas estressadas, as quais apresentam g_s inferior a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (Flexas et al., 2004; Salinet, 2009), mostrando que essas plantas demoraram mais para sentir os efeitos da seca, possivelmente devido aos maiores valores de umidade gravimétrica do substrato observados nas plantas 2la4 na condição controle.

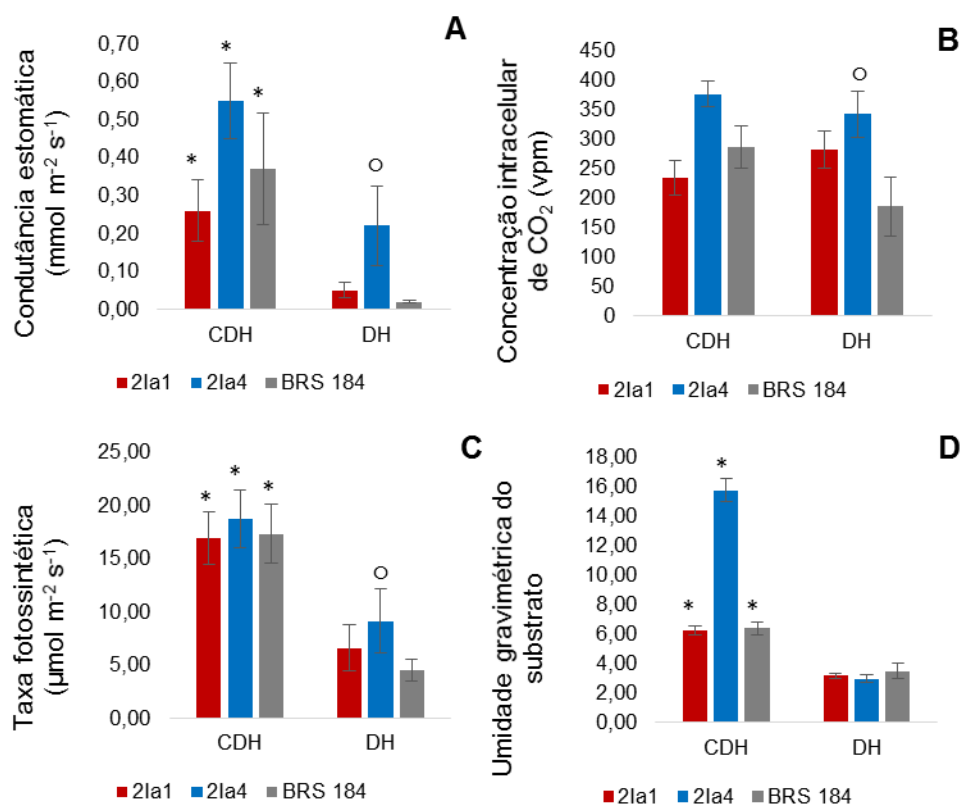


Figura 9. Trocas gasosas e umidade gravimétrica do substrato usado no cultivo de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção *AtGo/S2* e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184. A) Condutância estomática; B) Concentração intracelular de CO₂; C) Taxa fotossintética; D) Umidade gravimétrica do substrato. Em cada material genético, médias ± erro padrão indicadas por asterisco (*) entre condições hídricas e pelo sinal (°) dentro da condição DH são significativamente maiores pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$); $n=9$

O acúmulo de água no substrato juntamente com o aumento de transcritos de galactinol e rafinose observados nas plantas do evento 2la4 provavelmente influenciaram os resultados de trocas gasosas observados neste trabalho, corroborando a possibilidade desses carboidratos terem atuado como osmoprotetores no ajustamento osmótico. Segundo Bray (1997), durante o ajustamento osmótico o potencial osmótico no citosol é reduzido, mantendo o potencial hídrico e o turgor das células próximo do nível ótimo. Quando o turgor é mantido, processos como a condutância estomática, taxa de assimilação de CO₂ fotossíntese e expansão dos tecidos foliares são parcialmente mantidos mesmo em condições de baixo potencial hídrico no solo, possibilitando o desenvolvimento das

plantas mesmo em condições de estresse (ELSAYED; RAFUDEEN; GOLLDACK, 2014; PATTANAGUL; MADORE, 1999; VINOCCUR; ALTMAN, 2005). No presente estudo, embora não tenha havido interação entre materiais genéticos e condições hídricas, notou-se uma redução da taxa fotossintética de todas as plantas avaliadas, sendo esta uma das principais respostas ao déficit hídrico (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006). Nas plantas 2la4, apesar de ter sido observada redução da taxa fotossintética sob déficit hídrico, nesta condição, os valores foram maiores quando comparados aos demais materiais. Isso pode estar relacionado ao fato de que o ajustamento osmótico não é capaz de impedir que a taxa fotossintética seja reduzida sob condições de déficit hídrico. No entanto, a manutenção da turgescência, comprovada pelos maiores valores de g_s nas plantas 2la4, provavelmente permitiram que mesmo sob déficit hídrico a fotossíntese e outras importantes atividades fisiológicas fossem mantidas, mesmo que baixas, possibilitando a redistribuição de carbono e nitrogênio em tais plantas como sugerido por KOBATA; PALTA e TURNER, (1992) e PALTA et al. (1994).

4.6. Análise de crescimento de plantas de soja GMs com o gene *AtGo/S2* sob déficit hídrico

Plantas de soja da cultivar convencional BRS 184 e dos eventos GMs 2la1 e 2la4 foram avaliadas em relação à massa seca de folhas (MSF), massa seca de caules mais pecíolos (MSCP), massa seca de raízes (MSR) e massa seca total (MST) em condições controle e sob déficit hídrico. Em todos estes parâmetros, não houve interação significativa entre materiais genéticos e condições hídricas. Porém, menores valores foram observados em praticamente todas as plantas sob déficit hídrico, independentemente do material genético avaliado. Além disso, as plantas do evento 2la4 apresentaram menores valores na condição controle quando comparadas às plantas 2la1 e BRS 184 (Figura 10). Tal fato pode ser devido às plantas do evento 2la4 terem apresentado um padrão de crescimento mais lento antes do início da indução do déficit hídrico, onde era possível encontrar um grande número de plantas no estágio V_3 , enquanto nos outros materiais genéticos a maioria das plantas encontrava-se no estágio V_4 . Adicionalmente, os menores valores

observados nos parâmetros MSF, MSCF, MSR e MST das plantas do evento 2la4 podem estar relacionados à maior taxa de condutância estomática observada nas plantas do mesmo evento na condição controle, onde possivelmente a menor área foliar dessas plantas foi suficiente para manter as trocas gasosas mais altas neste evento quando comparado aos demais genótipos.

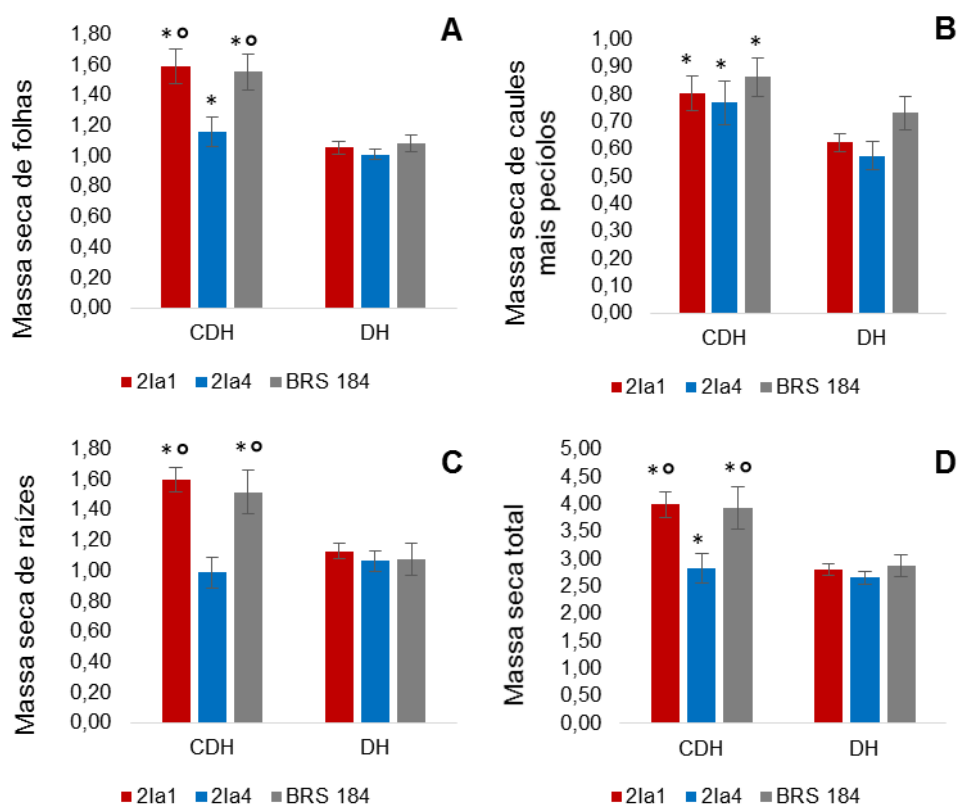


Figura 10. Parâmetros de crescimento de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção *AtGo/S2* e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184. A) MSF= massa seca de folhas; B) MSCP= massa seca de caules mais pecíolos; C) MSR= massa seca de raízes; D) MST= massa seca total. Em cada material genético, médias \pm erro padrão indicadas por asterisco (*) entre condições hídricas e pelo sinal (°) dentro da condição DH são significativamente maiores pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$); $n=9$

Para número de nós (NNOS), comprimento médio de internós (CMI), área foliar (AF) e taxa de crescimento relativo em altura (TCRalt), também não se detectou interação significativa entre materiais genéticos e condições hídricas (Figura 11). Nota-se que nesses parâmetros, exceto o número de nós, também se

observaram menores valores para todas as plantas sob déficit hídrico, independentemente do material genético avaliado. A ausência de interação na TCRalt das plantas avaliadas indica que a transformação de soja com o gene *35S:AtGo/S2* provavelmente não causou nenhum retardo no crescimento das plantas transformadas.

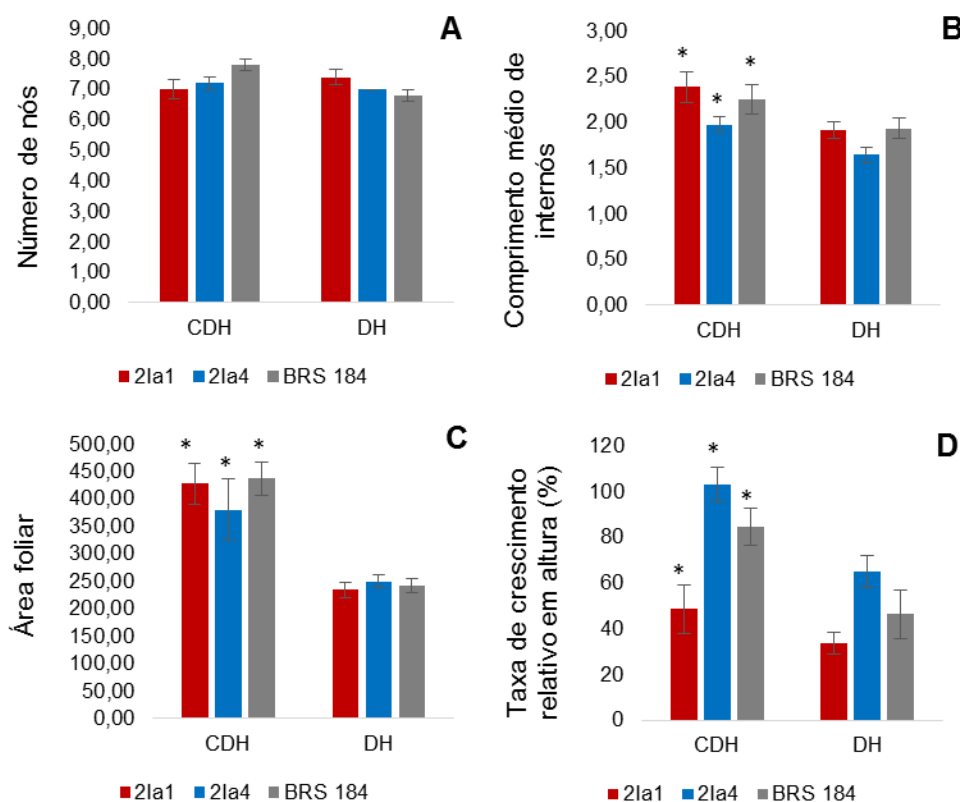


Figura 11. Parâmetros de crescimento de plantas de soja geneticamente modificadas com a construção *AtGo/S2* e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184. A) NNOS= Número de nós, B) CMI= comprimento médio de internós, C) AF= área foliar, D) TCRalt= taxa de crescimento relativo em altura. Em cada material genético, médias \pm erro padrão indicadas por asterisco (*) são significativamente maiores pelo teste Tukey; n=5.

Desta forma, é possível inferir que para o evento 2la4 o uso do promotor constitutivo *CaMV35S* não alterou as características de desenvolvimento das plantas transformadas. O promotor constitutivo 35S é frequentemente utilizado para controle da expressão gênica e foi por muito tempo associado ao retardo de crescimento das plantas na ausência de estresses (KASUGA, 2004; LIU, 1998; MORRAN et al., 2011; YAMAGUCHI-SHINOZAKI et al., 1999). No entanto, em soja, Barbosa (2013)

trabalhou com plantas GMs com a construção (pBI35S-AREB1) e observou que, dentre os eventos com baixo número de cópias do transgene, o evento A24.10 apresentou leve redução no número de folhas e o evento A2057.03 não apresentou nenhum retardo no crescimento. Marinho (2015) trabalhou com plantas GMs superexpressando os fatores de transcrição *AtAREB1* sob déficit hídrico com o uso do promotor *CaMV35S* e verificou que ao final do período experimental não houve diferenças para os parâmetros massa seca de raiz, massa seca de lâminas foliares e área foliar total quando as plantas foram comparadas sob condições bem irrigadas e sob déficit hídrico, indicando que este promotor pode ser utilizado com sucesso na obtenção de plantas de soja geneticamente modificadas sem causar retardo no crescimento.

4.7. Transpiração diária

Analisando-se os dados de transpiração diária obtidos através da pesagem dos vasos em dias sucessivos (Figura 12), juntamente com aqueles obtidos na umidade gravimétrica do substrato (Figura 9D), é possível notar que o evento 2la4 armazenou mais água na condição controle, ao passo que as plantas 2la1 e BRS 184 perderam mais água por transpiração nos primeiros dias de déficit hídrico. Com o passar dos dias, como o evento 2la4 apresentava maior volume de água armazenado no substrato no início do período de irrigação suspensa, estas plantas passaram a transpirar mais que as do evento 2la1 e as da cultivar BRS 184 no período intermediário de avaliação. Contudo, ao final do período experimental, os três materiais apresentaram comportamento semelhante, estando de acordo com os resultados da umidade gravimétrica do substrato (Figura 9).

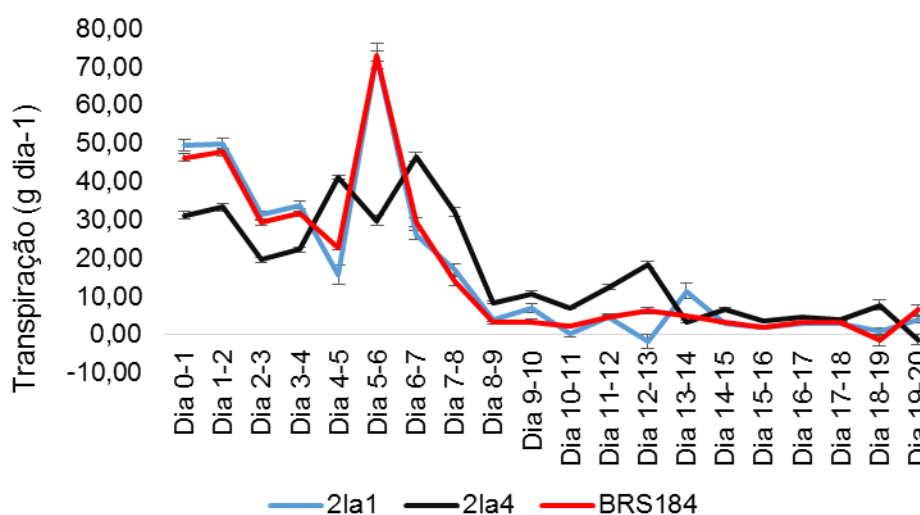


Figura 12. Transpiração diária das plantas *AtGo/S2* geneticamente modificadas e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184 durante 21 dias consecutivos de déficit hídrico. Valores representam médias \pm erro padrão; n=8.

4.8. Taxa de sobrevivência

Neste experimento, observou-se maior taxa de sobrevivência do evento 2la4 após 21 dias de irrigação suspensa seguidos de nove dias de reidratação. Por sua vez, as plantas da cultivar convencional BRS 184 apresentaram 100% de mortalidade (Figura 13A). Com relação ao evento 2la1, das oito plantas avaliadas, apenas uma manteve um único trifólio verde após a reidratação (Figura 13B). No entanto, este comportamento não pode ser atribuído à inserção do gene *AtGo/S2*, uma vez que apesar das plantas apresentarem o gene em seu genoma, este não se mostrou expresso. As plantas do evento 2la4, porém, apresentaram 100% de recuperação após o reestabelecimento da irrigação (Figura 13C), corroborando os dados observados por Taji et al. (2002), que demonstraram que plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene 35S:*AtGo/S2*, quando submetidas a 14 dias de déficit hídrico, apresentaram total recuperação após cinco dias de reidratação devido à redução na transpiração foliar, maior acúmulo de água no substrato e acúmulo de rafinose e galactinol nos tecidos, sugerindo que o aumento dos teores destes carboidratos teria feito com que estes atuassem como osmoprotetores.



Figura 13. Taxa de sobrevivência de plantas de soja *AtGo/S2* geneticamente modificadas e o “background” a cultivar convencional BRS 184 após 21 dias de irrigação suspensa seguidos de nove dias de reidratação. A) BRS 184, B) 2la1 e C) 2la4; n=8.

4.8.1. Parâmetros agronômicos

Com relação aos parâmetros agronômicos número de vagens com sementes (NVCS), número de vagens sem sementes (NVSS), massa seca total de sementes (MSTS), número total de sementes (NTS), número de sementes por vagem (NSV), peso de mil sementes (P1000), também não se detectou interação significativa entre materiais genéticos e condições hídricas. Porém, é válido ressaltar que todas as plantas foram mantidas sob condições bem-irrigadas após sua transferência para vasos de 8L, após terem passado por um curto período de déficit hídrico durante o período inicial de desenvolvimento. Desta forma, considerando-se a média das plantas provenientes das duas condições hídricas estabelecidas conforme o item 3.6 para cada material genético, não se observaram diferenças entre as plantas do evento 2la4 e seu “background” genético, a cultivar convencional BRS 184 (Figura 14). Este comportamento poderia ser explicado pelo fato de que o ajustamento osmótico em soja permite que estas plantas se tornem mais tolerantes ao déficit hídrico por serem capazes de manter seu desenvolvimento em condições de estresse, porém sem necessariamente levar ao aumento na produção de sementes (SERRAJ; SINCLAIR, 2002). Por sua vez, as plantas do evento 2la1 apresentaram menores valores para NVCS e NVSS comparadas ao “background” (BRS 184). Tal resultado pode estar relacionado ao complexo padrão de integração do transgene no genoma da soja, onde possíveis rearranjos cromossômicos podem ter afetado o desenvolvimento normal dessas plantas (BARBOSA et al., 2013).

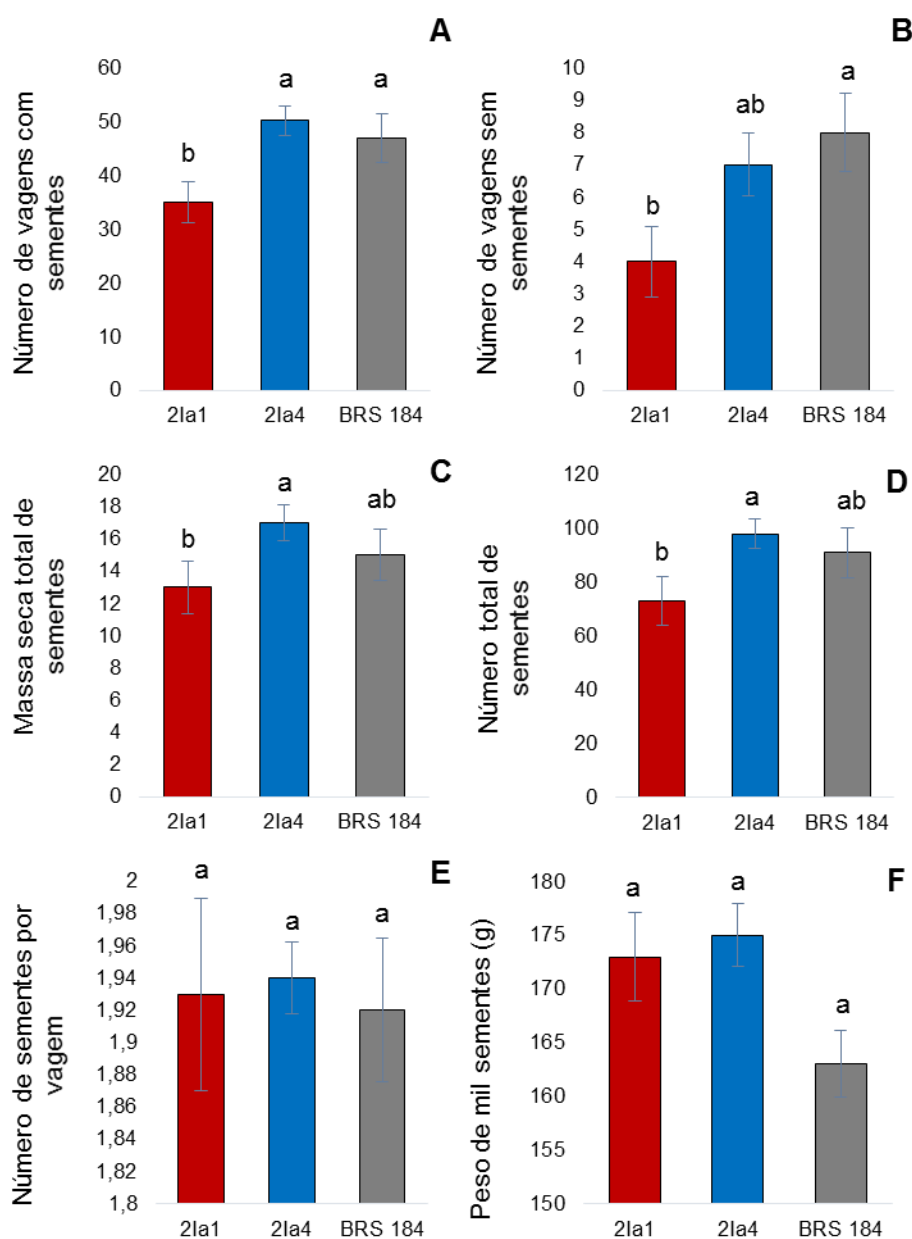


Figura 14. Parâmetros agrônômicos (por planta) de soja *AtGo/S2* geneticamente modificadas e seu “background”, a cultivar convencional BRS 184. A) NVCS= Número de vagens com sementes. B) NVSS= Número de vagens sem sementes. C) MSTS= Massa seca total de sementes (g). D) NTS= Número total de sementes. E) NSV= número de sementes por vagem. F) P1000= Peso de mil sementes. Médias \pm erro padrão seguidas de letras iguais não diferiram entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$); $n=18$.

Considerando-se que no presente estudo, de maneira geral, as plantas do evento 2la4 apresentaram resultados moleculares, de trocas gasosas, umidade gravimétrica do solo e de taxa de sobrevivência mais promissoras frente ao déficit

hídrico induzido em condições de casa de vegetação, tal evento foi selecionado para ser levado a campo, na área experimental da Embrapa Soja, durante a safra 2014/2015 para ser avaliado sob diferentes regimes hídricos em condições reais de lavoura.

5. CONCLUSÃO

- A construção gênica 35S:*AtGo/S2* foi inserida com sucesso em plantas de soja da cultivar convencional BRS184, via *Agrobacterium tumefaciens* e cinco eventos positivos foram obtidos: 21a1, 21a2, 21a3, 21a4, 21a9;
- A introdução do gene *AtGo/S2* levou ao acúmulo de transcritos de galactinol e rafinose que podem ter auxiliado no ajuste osmótico celular em condições de déficit hídrico;
- A expressão do gene *AtGo/S2* sob controle do promotor CaMV 35S em plantas de soja não resultou em retardo do crescimento dos eventos avaliados.

6. REFERÊNCIAS

- AHUJA, M. R.; FLADUNG, M. Integration and inheritance of transgenes in crop plants and trees. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 4, p. 779–790, 2014.
- AMARA, I. et al. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 9, p. 864–873, 15 jun. 2013.
- AMIARD, V. et al. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. **Plant physiology**, v. 132, n. 4, p. 2218–2229, 1 ago. 2003.
- BARBOSA, E. G. G. et al. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 719–730, 2013.
- BATTAGLIA, M.; COVARRUBIAS, A. A. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. June, p. 190, 2013.
- BENTSINK, L. et al. Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 124, n. 4, p. 1595–1604, 2000.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 411–424, mar. 2008.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 48–54, fev. 1997.
- BUSCH, W.; WUNDERLICH, M.; SCHÖFFL, F. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 41, n. 1, p. 1–14, 17 nov. 2004.
- CASALI, N.; PRESTON, A. **E. coli Plasmid Vectors**. New Jersey: Humana Press, 2003. v. 235
- CASU, R. E.; SELIVANOVA, A.; PERROUX, J. M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 1, p. 167–177, 2012.
- CHAVES, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2365–2384, 10 set. 2004.
- CHAWLA, R. et al. Transgene expression produced by biolistic-mediated, site-specific gene integration is consistently inherited by the subsequent generations. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, n. 2, p. 209–218, 2006.
- CHEN, G. Q.; LIN, J. T. Use of quantitative polymerase chain reaction for determining copy numbers of transgenes in *Lesquerella fendleri*. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 5, n. 3, p. 415–421, 2010.

CHEN, I.; DUBNAU, D. DNA uptake during bacterial transformation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 241–249, mar. 2004.

CHEN, M. et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 2, p. 299–305, 9 fev. 2007.

CHEN, T. T. et al. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 88–95, 1993.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in plant science**, v. 12, n. 10, p. 444–451, 2007.

CHO, S. M. et al. Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Botany**, v. 88, n. 5, p. 452–461, 2010.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em abril de 2013.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_bol_etim_graos_4o_levantamento.pdf> acesso em: 07 de fevereiro de 2012.

CRAUFURD, P. Q.; WHEELER, T. R. Climate change and the flowering time of annual crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 9, p. 2529–2539, 1 jul. 2009.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of Dry Membranes by Mixtures of Hydroxyethyl Starch and Glucose: The Role of Vitrification. **Cryobiology**, v. 35, n. 1, p. 20–30, ago. 1997.

CROWE, J. H. et al. Anhydrobiosis: Cellular Adaptation to Extreme Dehydration. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 1445–1477.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701–703, 17 fev. 1984.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S145, maio 2002.

CURTIS, M. D. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. **Plant Physiology**, v. 133, n. 2, p. 462–469, 11 set. 2003.

- DEVI, M. J. et al. Relationships Between Transpiration Efficiency and Its Surrogate Traits in the rd29A:DREB1A Transgenic Lines of Groundnut. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 4, p. 272–283, ago. 2011.
- DIERKING, E. C.; BILYEU, K. D. Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 12, p. 1329–35, 15 ago. 2009.
- DOWNIE, B. Expression of a GALACTINOL SYNTHASE Gene in Tomato Seeds Is Up-Regulated before Maturation Desiccation and Again after Imbibition whenever Radicle Protrusion Is Prevented. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1347–1359, 1 mar. 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- DUBOUZET, J. G. et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 751–63, fev. 2003.
- ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, p. 1–8, 2014.
- EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2005. **Sistemas de Produção**, p. 242, 2005.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/historia> acesso em: 03 de janeiro de 2013.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br> acesso em: 2014.
- ENGELS, C. et al. Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 556–565, dez. 2013.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673–689, fev. 2015.
- FLEXAS, J. et al. Diffusive and Metabolic Limitations to Photosynthesis under Drought and Salinity in C 3 Plants. **Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 269–279, maio 2004.
- FOWLER, S. Arabidopsis Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. 8, p. 1675–1690, 1 ago. 2002.
- FUJITA, M. et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **The Plant Journal**, v. 39, n. 6, p. 863–876, set. 2004.

FUJITA, Y. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 17, n. 12, p. 3470–3488, 1 dez. 2005.

FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, n. 4, p. 509–525, jul. 2011.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 9901, p. 151–158, 1968.

GAO, S.-Q. et al. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant cell reports**, v. 28, n. 2, p. 301–11, fev. 2009.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 02, p. 259, dez. 2004.

GILMOUR, S. J. et al. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 16, n. 4, p. 433–42, nov. 1998.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 12 fev. 2010.

GOLLDACK, D.; LÜKING, I.; YANG, O. Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1383–1391, 2011.

HARBORNE, J. B. Progress in botany. **Phytochemistry**, Progress in Botany. v. 15, n. 10, p. 1571, jan. 1976.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 79–102, 1997.

HARITATOS, E.; AYRE, B. G.; TURGEON, R. Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. **Plant physiology**, v. 123, p. 929–937, 2000.

HIMURO, Y. et al. Arabidopsis galactinol synthase AtGolS2 improves drought tolerance in the monocot model *Brachypodium distachyon*. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 13, p. 1127–31, 15 ago. 2014.

HINCHEE, M. A. W. et al. Production of Transgenic Soybean Plants Using Agrobacterium-Mediated DNA Transfer. **Bio/Technology**, v. 6, p. 915–922, 1988.

HITZ, W. D. et al. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant physiology**, v. 128, n. 2, p. 650–660, 2002.

- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.
- HOOD, E. E. et al. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 3, p. 1291–1301, 1986.
- HOOD, E. E. et al. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v. 2, p. 208–218, 1993.
- HU, H. et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 12987–92, 29 ago. 2006.
- HU, H. et al. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant molecular biology**, v. 67, n. 1-2, p. 169–81, maio 2008.
- HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 715–41, 29 jan. 2014.
- HYMOWITZ, T. et al. Stability of sugar content in soybean strains. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 3, n. 5, p. 367–373, 11 nov. 2008.
- ISODA, A.; WANG, P. Leaf Temperature and Transpiration of Field Grown Cotton and Soybean under Arid and Humid Conditions. **Plant Production Science**, v. 5, p. 224–228, 2002.
- ITO, Y. et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant & cell physiology**, v. 47, n. 1, p. 141–53, jan. 2006.
- JAGLO-OTTOSEN, K. R. et al. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5360, p. 104–6, 3 abr. 1998.
- JICA – Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 01 julho de 2011.
- KARNER, U. et al. myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 405, p. 1981–7, set. 2004.
- KARR-LILIENTHAL, L. K. et al. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v. 97, n. 1, p. 1–12, out. 2005.
- KASUGA, M. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 287–91, mar. 1999.

KASUGA, M. et al. A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 3, p. 346–350, 2004.

KOBATA, T.; PALTA, J. A.; TURNER, N. C. Rate of Development of Postanthesis Water Deficits and Grain Filling of Spring Wheat. **Crop Science**, v. 32, n. 5, p. 1238, 1992.

KOHLI, A. et al. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant molecular biology**, v. 52, n. 2, p. 247–58, maio 2003.

KOOTER, J.; MATZKE, M.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in plant science**, v. 4, n. 9, p. 340–347, set. 1999.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.

KULCHESKI, F. R. **IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS**. 2013. 51 f. Dissertação 2013. (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

KUMAR, V. et al. Sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by genotype and growing location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5081–5085, 2010.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275–294, fev. 2002.

LEE, K.; JEON, H.; KIM, M. Optimization of a mature embryo-based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 3, p. 237–244, 2002.

LI, X.-P. et al. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 110, n. 8, p. 1355–62, maio 2005.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31–67, jan. 1994.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239–247, 2002.

LIU, J. J. J. et al. Galactinol synthase (GS): Increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science**, v. 134, p. 11–20, 1998.

LIU, Q. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 10, n. 8, p. 1391–1406, 1 ago. 1998.

LIU, Y. et al. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of Escherichia coli and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. **Current Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 373–378, 2010.

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, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 13, p. 3509–17, ago. 2010.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: julho de 2015.

MARTEAU P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 6, p. 153–157, 1 maio 2002.

MARCOLINO-GOMES, J. et al. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

MARINHO JP, KANAMORI N, FERREIRA LC et al. Characterization of molecular and physiological responses under water deficit of genetically modified soybean plants overexpressing the AtAREB1 transcription factor. **Plant Mol Biol Rep**. doi: 10.1007/s11105-015-0928-0 (In Press), 2015.

MENG, L.; ZIV, M.; LEMAUX, P. G. Nature of stress and transgene locus influences transgene expression stability in barley. **Plant Molecular Biology**, v. 62, p. 15–28, 2006.

MESSINA, M.; MESSINA, V. The role of soy in vegetarian diets. **Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 855–88, ago. 2010.

MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LÜTHY, J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 617–622, jan. 1994.

MIEOG, J. C.; HOWITT, C. A.; RAL, J.-P. Fast-tracking development of homozygous transgenic cereal lines using a simple and highly flexible real-time PCR assay. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 71, jan. 2013.

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 443–462, 2010.

MIZOI, J. et al. GmDREB2A;2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. **Plant physiology**, v. 161, n. January, p. 346–61, 2013.

MORRAN, S. et al. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 230–249, 2011.

NAKASHIMA, K. et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 51, n. 4, p. 617–30, ago. 2007.

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

NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em Plantas. **Biociência**, v. 23, p. 12–18, 2001.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant physiology**, v. 147, n. July, p. 1251–1263, 2008.

OH, S.-J. et al. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant physiology**, v. 138, n. 1, p. 341–51, maio 2005.

OLHOFT, P. M.; FLAGEL, L. E.; SOMERS, D. A. T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the Agrobacterium-mediated cotyledonary-node method. **Plant biotechnology journal**, v. 2, n. 4, p. 289–300, jul. 2004.

OLTMANN, H. et al. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the Agrobacterium chromosome. **Plant physiology**, v. 152, n. 3, p. 1158–66, mar. 2010.

PALTA, J. A. et al. Remobilization of Carbon and Nitrogen in Wheat as Influenced by Postanthesis Water Deficits. **Crop Science**, v. 34, n. 1, p. 118, 1994.

PANIKULANGARA, T. J. et al. Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 136, n. October, p. 3148–3158, out. 2004.

PATAKAS, A. et al. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 361–367, ago. 2002.

PATTANAGUL, W.; MADORE, M. Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. **Plant physiology**, v. 121, n. 3, p. 987–993, nov. 1999.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. **Molecular biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–30, ago. 1996.

PAZ, M. M. et al. Assessment of conditions affecting Agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, v. 136, p. 167–179, 2004.

PAZ, M. M. et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 206–213, 2006.

PELLEGRINESCHI, A. et al. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada**, v. 47, n. 3, p. 493–500, jun. 2004.

PENNISI, E. PLANT GENETICS: The Blue Revolution, Drop by Drop, Gene by Gene. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 171–173, 11 abr. 2008.

PENNYCOOKE, J. C.; JONES, M. L.; STUSHNOFF, C. Down-regulating alpha-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. **Plant physiology**, v. 133, n. October, p. 901–909, 2003.

PESHEV, D. et al. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 4, p. 1025–38, fev. 2013.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. **Seed Science Research**, v. 11, n. February 2007, p. 185–197, 2001.

PETERS, S. et al. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): Both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 1947–1956, 2007.

PETHERICK, A. High hopes for Brazilian science. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 674–5, 10 jun. 2010.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

POLIZEL, A. M. et al. 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 : GMR**, v. 10, n. 4, p. 3641–56, jan. 2011.

PRICE, A. H. et al. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. **Field Crops Research**, v. 76, n. 1, p. 11–24, jun. 2002.

PROCTOR, M. C. F.; PENCE, V. C. Vegetative tissues: bryophytes, vascular resurrection plants and vegetative propagules. In: **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p. 207–237.

QIN, F. et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 50, n. 1, p. 54–69, abr. 2007.

QUEIROZ, L. N. **TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE HaHB11 RELACIONADO À TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS**. 2014. 42 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

QUICK, P. et al. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. **Planta**, v. 177, n. 4, p. 535–546, abr. 1989.

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. 410–418, mar. 2008.

REGUERA, M.; PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2011, p. 186–194, 2012.

RIVERO, R. M. et al. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19631–19636, 2007.

ROLLA, A. A. et al. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, v. 23, p. 75–87, 2014.

SAKUMA, Y. et al. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **The Plant cell**, v. 18, n. 5, p. 1292–309, maio 2006a.

SAKUMA, Y. et al. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, p. 18822–7, 5 dez. 2006b.

SALINET, L. H. **Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

SANTOS, T. B. et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.

SATO, H. et al. Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Kariyutaka. **Plant Biotechnology**, v. 24, p. 533–536, 2007.

SCHRAMM, F. et al. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 759–772, 2006.

SCHRAMM, F. et al. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 53, n. 2, p. 264–74, jan. 2008.

SCHUBERT, D. et al. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **The Plant cell**, v. 16, n. October, p. 2561–2572, 2004.

SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Soja análise da conjuntura agropecuária**. Curitiba, 2014. 18p.

SENGUPTA, S. et al. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? **FEBS Letters**, v. 586, n. 10, p. 1488–1496, 2012.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 333–341, 2002.

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

SIRICHANDRA, C. et al. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 5, p. 1439–1463, 2009.

SOARES, A. P. G. **Caracterização in silico de genes envolvidos na construção de cassetes de silenciamento do gene da estaquiose sintase via interferência por RNA**. 123 f. Tese 2011. (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SONG, J. et al. BIBAC and TAC clones containing potato genomic DNA fragments larger than 100kb are not stable in Agrobacterium. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 5, p. 958–964, 1 set. 2003.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The roles of two distinct galactinol synthases. **Plant Journal**, v. 21, p. 249–258, 2000.

STEVENSON, J. M. et al. Inositol signaling and plant growth. **Trends in plant science**, v. 5, n. 6, p. 252–8, jun. 2000.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 858–867, 2010a.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Soybean physiology and gene expression during drought. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 1946–1956, jan. 2010b.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 58–65, jan. 2011.

STRAUSS, L. et al. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 349–354, 1998.

SUN, W. Q. et al. Stability of dry liposomes in sugar glasses. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 4, p. 1769–1776, abr. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 25, p. 614-622.

TAJI, T. et al. Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 29, n. 4, p. 417–426, 2002.

TAJI, T. et al. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and a *Rabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. **Plant physiology**, v. 135, n. July, p. 1697–1709, 2004.

TIE, W. et al. Reasons for lower transformation efficiency in indica rice using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: Lessons from transformation assays and genome-wide expression profiling. **Plant Molecular Biology**, v. 78, p. 1–18, 2012.

TURNER, N.; WRIGHT, G.; SIDDIQUE, K. Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. **Advances in Agronomy**, 2001.

USDA (2015) United States Department of Agriculture. http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=AGENCY_REPORTS&parentnav=NEWSROOM&deployment_action=agencyreports. Acessado em setembro de 2015

VADEZ, V. et al. DREB1A promotes root development in deep soil layers and increases water extraction under water stress in groundnut. **Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 45–52, 5 jan. 2013.

VAIN, P. et al. Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. **Theoretical and applied genetics**, v. 105, n. 6-7, p. 878–889, nov. 2002.

VAN DEN ENDE, W.; PESHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 689–697, dez. 2011.

VAN DEN ENDE, W.; VALLURU, R. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 1, p. 9–18, jan. 2009.

- VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123–132, abr. 2005.
- VOLK, G. M.; HARITATOS, E. E.; TURGEON, R. Galactinol Synthase Gene Expression in Melon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 1, p. 8–15, 2003.
- WANG, C.-T.; YANG, Q.; YANG, Y.-M. Characterization of the ZmDBP4 gene encoding a CRT/DRE-binding protein responsive to drought and cold stress in maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 2, p. 575–583, 11 ago. 2010.
- WANG, S. et al. The characteristics of Na⁺, K⁺ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. **Journal of Arid Environments**, v. 56, n. 3, p. 525–539, fev. 2004.
- WASSENEGGER, M.; PÉLISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 349–362, 1998.
- WITCOMBE, J. R. et al. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1492, p. 703–16, 27 fev. 2008.
- WOLKERS, W. F. et al. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1-2, p. 196–206, jan. 2001.
- WU, A. et al. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. **British journal of cancer**, 2008.
- WU, E. et al. Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 1, p. 9–18, 2014.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **PLANT CELL**, v. 14, n. suppl_1, p. S165–183, 1 maio 2002.
- XU, Z. et al. Functions of the ERF transcription factor family in plants. **Botany**, 2008.
- XUE, H.; CHEN, X.; LI, G. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 5, p. 483–9, out. 2007.
- YAMADA, T. et al. Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of Agrobacterium-mediated transformation in soybean. **Plant Biotechnology**, v. 27, p. 217–220, 2010.
- YAN, L.; SPITZNAGEL, E. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, 2009.

YOSHIDA, T. et al. 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: for cell and molecular biology**, v. 61, n. 4, p. 672–85, fev. 2010.

ZHANG, Y. et al. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry1le gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 16 jan. 2015.

ZHAO, T.-Y. et al. Expression of the maize Galactinol synthase gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 647–655, ago. 2004a.

ZHAO, T.-Y. et al. Expression of the maize Galactinol synthase gene family: (I) Expression of two different genes during seed development and germination. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 634–646, ago. 2004b.

ZHAO, T.-Y.; MEELEY, R. B.; DOWNIE, B. Aberrant processing of a Maize GALACTINOL SYNTHASE transcript is caused by heat stress. **Plant Science**, v. 165, n. 1, p. 245–256, jul. 2003.

ZUO, J. et al. Marker-free transformation: Increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 173–180, 2002.

ZUTHER, E. et al. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 576, p. 169–173, 2004.