

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA
COM A FORMA CONSTITUTIVA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *AREB1*

Juliana Paula Leite
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Maio de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA
COM A FORMA CONSTITUTIVA DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *AREB1*

Juliana Paula Leite

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Co - orientadora: Dra. Renata Fuganti Pagliarini

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
04 de Maio de 2012

Leite, Juliana Paula
L533o Obtenção de plantas transgênicas de soja com a forma constitutiva
do fator de transcrição *AREB1* / Juliana Paula Leite. -- Jaboticabal,
2012
xiv, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Francismar Corrêa Marcelino Guimarães,
Sônia Marli Zingaretti
Bibliografia

1. Soja. 2. Seca. 3. Transgênicos. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.52

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PAULA LEITE – nascida em 2 de março de 1987, na cidade de Santa Mariana – PR, é filha de Orlando de Paula Leite e Vilma de Jesus Santos Leite. Formou-se bióloga, em dezembro de 2009 pela Universidade Estadual do Norte do Paraná, – Campus Luiz Meneguel, 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 2010, 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 e co-orientação da Dra. Renata Fuganti Pagliarini.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci.

Dedico,

À minha mãe Vilma de Jesus Santos Leite e ao meu pai Orlando de Paula Leite por terem me guiado até aqui! Amo vocês.

Ofereço,

Ao meu noivo e amado Carlos Alberto Uzai Nishida, pois, apesar da distância, sempre estivemos perto e jamais perdemos a esperança de um dia ficarmos realmente juntos.

Ao meu irmão Éder de Paula Leite, um amor único que não se explica.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais por me tornarem a pessoa que sou e que, apesar das dificuldades, nunca me deixaram desistir;

Ao meu noivo Beto por estar sempre disposto a me escutar, aconselhar, ouvir meus choros e por me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos. Amo-te muito;

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal pelas grandes experiências trocadas e pelos bons momentos vividos. Especialmente ao Elton Gargioni Barbosa, um grande amigo e parceiro no desenvolvimento deste trabalho. À Juliane Praela Marinho, pela amizade e grande colaboração em boa parte desta dissertação. À técnica do laboratório de Biotecnologia, Silvana Rockenbach Marin, pelas valiosas dicas e fundamental participação em cada pedacinho de todos os resultados alcançados. Obrigada! Sem vocês este trabalho não seria possível;

Às amigas, Adriana Maria Polizel, Aguida Morales Pereira, Juliane Praela Marinho, Larissa Giroto e Maria Cecília Soldera, grandes companheiras, para as quais sempre guardarei um carinho especial;

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

Aos amigos Hérica Tertulino, Paula Brunini, Camila Davolos, Juliana Rossi, Viviane Formice Vianna e Ana Rita Lemes pela força e pelos agradáveis momentos convividos em Jaboticabal;

À grande amiga Roberta Borges dos Santos, uma pessoa incrível, exemplo de dedicação, garra e companheirismo;

À minha orientadora professora Dra. Janete Aparecida Desidério pela contribuição e compreensão;

À minha co-orientadora Dra. Renata Fuganti Pagliarini pelas correções do trabalho;

À Dra. Josirley de Fátima Corrêa Carvalho pelas conversas e sugestões fundamentais;

Aos professores membros da banca de qualificação, Sandra Helena Uneda Trevisolli e Sônia Marli Zingaretti pelas valiosas dicas;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno pela oportunidade proporcionada para a realização desse trabalho. Um grande exemplo de profissional que levarei por toda a vida e;

À Capes e ao JICA pelo auxílio financeiro.

Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Soja: benefícios e importância econômica	4
2.2. O déficit hídrico e as perdas na produção	5
2.3. Diferentes mecanismos de resposta das plantas ao déficit hídrico	6
2.4. Genes envolvidos na resposta vegetal ao déficit hídrico.....	8
2.5. O papel do hormônio ácido abscísico (ABA) na sinalização do estresse vegetal.....	10
2.5.1 Características dos genes induzidos por ABA: a sequência ABRE.....	11
2.6. Proteínas <i>bZIPs</i> e os fatores de transcrição <i>AREBs/ABFs</i>	12
2.6.1. Fator de transcrição <i>AREB/ABF</i>	14
2.6.2. <i>AREB1ΔQT</i> - a forma constitutivamente ativa de <i>AREB1</i>	18
2.7. Transformação genética em soja	20
2.8. Caracterização molecular dos eventos transgênicos	23
2.8.1 Número de cópias, inserção e zigosidade.....	23
2.8.2. Técnicas para quantificação do transgene inserido	26
2.8.3. Método comparativo ΔC_t para quantificação do número de cópias, e expressão relativa gene de interesse	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Construções utilizadas no processo de transformação	30
3.2. Obtenção das plantas de soja transformadas com a construção 35S: <i>AtAREB1ΔQT</i>	30
3.3. Análise de plantas transformadas de soja.....	32
3.4. Identificação de plantas quiméricas	33

3.5. Segregação dos eventos na geração T ₁	33
3.6. <i>Southern blot</i> para análise do número de insertos do gene alvo.....	33
3.6.1. Extração de DNA genômico	34
3.6.2. Digestão das amostras e preparo da sonda	34
3.7. Quantificação do número de cópias do transgene via qPCR pelo método 2 ^{-ΔCt}	36
3.8. Análise da expressão gênica relativa do transgene via RT-qPCR	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Identificação de plantas positivas estáveis e quiméricas para o transgene 35S <i>AtAREB1ΔQT</i>	39
4.2. Segregação dos eventos na geração T ₁	41
4.3. Análise do número de insertos do gene alvo via <i>Southern blot</i> e número de cópias via qPCR.....	43
4.4. Expressão relativa do gene <i>AtAREB1ΔQT</i> em plantas T ₁	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VIII. ANEXO	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características vegetais associados ao evitamento e à tolerância a seca em soja.....	8
Figura 2. Produtos gênicos envolvidos na tolerância ao estresse.....	9
Figura 3. Em A, estrutura primária de um domínio bZIP. Em B, a estrutura tridimensional do domínio <i>bZIP</i> GCN4 ligado ao DNA.....	13
Figura 4. Estrutura da família das proteínas <i>AREB</i>	15
Figura 5. Ilustração da via de sinalização de ABA para o fator de transcrição <i>AREB1</i>	16
Figura 6. Ilustração da via de sinalização de ABA.....	18
Figura 7. Construções dos mutantes de <i>AREB1</i> gerados, com suas respectivas deleções nos domínios conservados da região N-terminal de <i>AREB1</i>	19
Figura 8. Em A: planta T ₁ homocigota com quatro cópias e dois insertos. Em B: planta T ₁ homocigota com duas cópias e um inserto. Em C: planta T ₁ hemocigota ou heterocigota com uma cópia e um inserto.....	26
Figura 9. Em A: Plasmídeo pBI221 com o inserto (35S promotor + <i>AREB1</i> ΔQT + NOS terminador): tamanho de 4.486 pb. Em B: Plasmídeo pAC321 contendo a sequência do gene <i>Ahas</i> (promotor/ <i>Ahas</i> 5'UTR (região não transcrita 5') + <i>Ahas</i> sequência codificadora + terminador/ <i>Ahas</i> 3'UTR (região não transcrita 3')): tamanho de 8.673pb.....	30
Figura 10. Plantas positivas com o gene alvo <i>AtAREB1</i> ΔQT, confirmadas como não quiméricas.....	39
Figura 11. Quatro plantas foram classificadas como quimeras para a construção <i>35S:AtAREB1</i> ΔQT.....	40
Figura 12. Plantas T ₀ identificadas como estáveis para o gene <i>AtAREB1</i> ΔQT.....	40
Figura 13. Plantas identificadas como negativas para o gene de seleção <i>ahas</i>	41

Figura 14. PCR das 14 plantas positivas T ₁ provenientes do evento T ₀ 2651.....	41
Figura 15. Alteração fenotípica da planta T ₁ 2654-14 proveniente do evento T ₀ 2654.....	42
Figura 16. Alteração fenotípica da planta T ₁ 2651-31 proveniente do evento T ₀ 2651. Em A: fenótipo da planta T ₁ mostrando folhas enrugadas, em B: vagens com muitos pelos, em C: sementes verdes, com atraso na maturação.....	43
Figura 17. Plantas da geração T ₀ analisadas pela técnica de <i>Southern blot</i>	44
Figura 18. 28 Plantas da geração T ₁ analisadas pela técnica de <i>Southern blot</i>	45
Figura 19. Determinação da eficiência do sistema multiplex <i>TaqMan</i> para os alvos <i>AtAREB1</i> e endógeno <i>GmLectina</i>	45

LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

	Página
Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados na amplificação por PCR para confirmação dos eventos positivos.....	32
Tabela 2. Sequências de iniciadores e sondas da análise do número de cópias do gene alvo por qPCR.....	36
Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados na análise da expressão do transgene.....	38
Tabela 4. Segregação dos eventos GM na geração T ₁	42
Tabela 5. Plantas T ₀ que não segregaram.....	47
Tabela 6. Caracterização dos eventos 2639, 2651 e 2654 e seus descendentes.....	50
Gráfico 1. Expressão relativa dos 28 eventos T ₁ provenientes dos eventos 2639, 2651 e 2654.....	51

OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA COM A FORMA CONSTITUTIVA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *AREB1*

RESUMO - No cenário atual de mudanças climáticas, com o aumento da população mundial e crescente demanda por alimentos, as ferramentas biotecnológicas veem sendo utilizadas na obtenção de plantas mais tolerantes a estresse ambientais como a seca, que provoca perdas financeiras e de produção significativas aos produtores. Os fatores de transcrição, são genes potenciais na estratégia de reduzir os prejuízos decorrentes de períodos de déficit hídrico, pois atuam controlando a expressão de genes estresse-induzidos e têm sido estudados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* e em culturas de interesse agrônomo. O fator de transcrição *AtAREB1 Δ QT*, consiste na forma constitutivamente ativa de *AREB1*, (*ABA Responsive Element Binding* – elemento de ligação de resposta ao ABA) que está envolvido, na via de sinalização ABA (ácido abscísico) dependente de resposta ao estresse hídrico em plantas. O objetivo do presente trabalho foi introduzir em soja, via biobalística, a construção gênica *pBI35S Ω :AtAREB1 Δ QT* e caracterizar molecularmente os eventos quanto ao número de cópias inseridas, e análise da expressão gênica do transgene. Para a caracterização molecular, foram utilizadas as metodologias de *Southern blot* e RT-qPCR. Um total de 12 linhagens independentes foram obtidas na geração T₀, com uma eficiência de transformação de 0,59%. Somente três eventos (2651, 2639 e 2654) segregaram e passaram o gene para a geração T₁. O número de cópias do transgene quantificado via qPCR, foi diferente, para cada linhagem geneticamente modificada (GM) analisada, variando de poucas cópias (1 a 2) a várias (17 cópias). Estes dados foram corroborados pelos resultados obtidos via *Southern blot*. O nível de expressão gênica relativa do transgene foi variável entre os eventos e a análise da segregação em plantas T₂ indicou que o transgene não seguiu as leis Mendelianas. Visando obter mais dados sobre o efeito do transgene na resposta ao estresse hídrico em soja, 3 eventos GMs considerados promissores foram selecionados, e serão utilizados no futuro em experimentos sob condições de estresse hídrico.

Palavras chaves: *bZIP*, RT-qPCR, Seca, Soja, *Southern blot*

OBTAINING OF TRANSGENIC SOYBEANS WITH THE CONSTITUTIVE FORM OF THE TRANSCRIPTION FACTOR AREB1

SUMMARY - In the actual scenario of climatic changes, with world population increase and growing food demand, biotechnological tools are being used to develop plants more tolerant to environmental stresses such as drought, which causes to producers, significant financial losses and yield production. The transcription factors are potential genes to be strategically used to reduce damage due to water deficit conditions, because they acts controlling the expression of numerous stress-induced genes and has been studied in the model plant *Arabidopsis thaliana* as well as in agronomic crops. The transcription factor, AtAREB1 Δ QT, consists in the constitutively active form of AREB1, (ABA Responsive Element Binding) that is involved, ABA signaling pathway (abscisic acid) dependent response pathway to drought in plants. The objective of this study was to insert the construction pBI35S Ω : AtAREB1 Δ QT in soybean, via biolistics, and molecularly characterization of the events on the number of inserted copies, and analyze the relative expression level of transgene. Twelve independent lines were identified in T₀ generation, with a transformation efficiency of 0.59%. Only three events (2651, 2639 and 2654) segregated and transmitted the gene for T₁ generation. The number of copies quantified using qPCR was different for each modified genetically (GM) line, ranging from a few copies (1 to 2 copies) to many copies (17 copies). These data were corroborated by Southern blot results. The relative expression level of transgene was variable between events and segregation analysis in T₂ generation showed that he transgene did not follow the Mendelian laws. Aiming to obtain more information on the effect of the transgene in response to water stress in soybean, three GM events considerate promising were chosen to be used in further experiments under water stress conditions.

Keywords: bZIP, RT-qPCR, Drought, Soybean, Southern blot

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o déficit hídrico nas lavouras de soja tem reduzido consideravelmente os rendimentos do grão, provocando perdas financeiras significativas aos produtores. Na safra 2012, já se fala em um aumento de 10% no preço da cultura devido à seca que ocorreu em parte do território nacional, diminuindo em até 20% a produtividade no sul do país (CONAB, 2012).

Nos vegetais, a tolerância a esta adversidade ambiental, consiste em uma característica controlada por múltiplos locos, tornando a adaptação a esta condição um fenômeno altamente complexo e relativamente difícil de ser trabalhado por métodos clássicos de melhoramento genético. Aliada às práticas convencionais, que visam diminuir os prejuízos decorrentes da seca, como o plantio direto, o controle de ervas daninha, irrigação (dependendo da disponibilidade e analisando custos) e o melhoramento genético, atualmente, a biotecnologia, através da tecnologia do DNA recombinante, se tornou mais uma ferramenta viável na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses bióticos, como o déficit hídrico.

Estudos moleculares de regulação gênica de plantas submetidas ao déficit hídrico têm identificado fatores de transcrição responsáveis pela ativação de vários genes, cujos produtos de expressão estão envolvidos na tolerância da planta durante a desidratação celular (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Vários fatores de transcrição como *ABF*, *bZIP*, *WLIP*, *MYB*, *MYC*, *MBY*, *MYB*, *ANAC*, *NAC*, *SNAC*, *CBF*, *BNCBF*, *DREB1*, *DREB2*, *AREB*, têm sido estudados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* e também em culturas de interesse econômico como, arroz, milho e soja. De acordo com a literatura científica, esses fatores são apontados como genes potenciais no aumento da tolerância aos diferentes estresses ambientais como a seca, frio, alta salinidade e congelamento, sendo os produtos oriundos destes trabalhos considerados a terceira geração de sucesso da biotecnologia (AGARWAL & JHA, 2010).

Em estudos realizados com *Arabidopsis*, o fator de transcrição *bZIP* (*Basic Leucine Zipper* – zíper de leucina básico) *AREB1* (*ABA Responsive Element Binding* –

elemento de ligação de resposta ao ABA) foi identificado como sendo responsável por controlar a expressão de genes induzidos por ABA (ácido abscísico) e seca, tais como os genes *H1S-3*, *AIA1*, *GBF3*, *RD20* e genes envolvidos na embriogênese tardia (proteínas *LEA* – *late embryogenesis abundant*) (FUJITA et al., 2005). No entanto, a superexpressão desse gene sob o controle do promotor constitutivo 35S (*CaMV-Cauliflower mosaic virus* – vírus do mosaico da couve-flor) em *Arabidopsis*, não resultou na indução da expressão de genes de resposta ao estresse como o *RD29B*, em condições normais de crescimento. Sabe-se hoje que, para que o gene *AREB1* ative os genes da cascata de resposta ao estresse, modificações pós transcricionais dependentes de ABA devem ocorrer, por isso, a ativação do FT *AREB1* é considerada ABA dependente.

Baseados nesta informação, FUJITA et al., (2005) construíram uma série de plasmídeos efetores com deleções na região N-terminal de *AREB1*, com a finalidade de identificar os possíveis domínios de ativação transcricional dessa proteína. Neste estudo, descobriu-se uma forma constitutivamente ativa de *AREB1*, o mutante *AREB1 Δ QT* que possui deleções na região N-terminal da proteína, mas mantém em sua construção o domínio conservado P (região de ativação transcricional) e o domínio nativo de ligação ao DNA *bZIP*. A superexpressão da construção *35S-AREB1 Δ QT* em *Arabidopsis*, levou à indução da expressão de genes de resposta ao estresse de déficit hídrico como o *RD29B* mesmo na ausência de ABA, e do estresse hídrico, além de aumentar a tolerância à seca nestas plantas GMs (FUJITA et al., 2005).

Assim, diante do cenário de mudanças climáticas e considerando-se a necessidade eminente do desenvolvimento de cultivares de soja mais tolerante ao déficit hídrico, estudos de pesquisa básica são importantes no intuito de se estudar a funcionalidade e o efeito de fatores de transcrição como o *AREB1 Δ QT* nessa cultura, em condição de estresse. Além disso, estudos de caracterização molecular dos eventos GMs obtidos são importantes, pois através dele é possível selecionar os melhores eventos. Por esta razão, após a obtenção das plantas transgênicas, faz-se necessária a caracterização molecular dos eventos quanto ao número de cópias inseridas, estudo de herança e a análise da expressão gênica, uma vez que o local de integração e

quantidade de cópias inseridas do transgene inserido pode influenciar, positivamente ou negativamente, na resposta da planta ao estresse.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo introduzir em soja, via biobalística, a construção gênica *pBI35S Ω :AtAREB1 Δ QT (35S:AtAREB1 Δ QT)*, e caracterizar molecularmente os eventos, quanto ao número de cópias inseridas e nível da expressão gênica relativa. Baseado nos resultados, as linhagens de soja GMs consideradas promissoras serão futuramente usadas em experimentos para avaliar o efeito do transgene em condição de déficit hídrico em soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Soja: benefícios e importância econômica

A soja é uma leguminosa de origem asiática e de grande importância econômica mundial. O grão é considerado versátil, pois, dá origem a vários produtos e subprodutos na agroindústria, na indústria química e de alimentos, além de ser fonte de proteínas, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (SAKAI & KOGISO, 2008) e fitoestrógenos (OSOSKI & KENNELLY, 2003). Adicionalmente, a soja é ainda apontada como uma cultura atrativa na produção de biocombustíveis, segundo EMBRAPA, (2011).

No Japão, o grão é utilizado há milênios na produção de alimentos tradicionais como o tofu, miso, shoyu e óleo vegetal, no entanto, o consumo de produtos a base de soja tem aumentado significativamente em todo mundo, devido aos efeitos benéficos a saúde, como a redução do colesterol, prevenção de câncer, diabetes, obesidade, além da proteção contra doenças do intestino e dos rins (FRIEDMAN & BRANDON, 2001). Entre 2010/2011, o consumo mundial do grão foi estimado em 252,55 milhões de toneladas, um aumento de 6,4% em relação as 237,31 milhões de toneladas consumidas na safra 2009/2010 de acordo com JOHN DEERE, (2011).

Como consequência da crescente demanda por subprodutos da soja, o aumento da produção é almejado a cada safra. Em 2007, a produção mundial do grão atingiu 219,8 milhões de toneladas (mi ton), com os Estados Unidos liderando a produção com 70,4 mi ton, seguidos pelo Brasil com 61 mi ton, Argentina com 47 mi ton e a China com 14,3 mi ton (MANAVALAN et al., 2009). Em 2011, a produção mundial alcançou 263,7 mi ton, em uma área plantada de 103,5 milhões de hectares, com os Estados Unidos ainda liderando a produção com 90,6 mi ton, seguidos pelo Brasil com 74,5 mi ton, Argentina com 49,5 mi ton e a China com 15,2 (mi ton) (EMBRAPA, 2012).

Apesar de não ser uma espécie nativa no território nacional, a soja está bem adaptada ao clima brasileiro, sendo nosso país considerado o segundo maior produtor mundial. Na safra 2010/2011 alcançamos 23,43 milhões de dólares em exportação e obtivemos uma produção de 75 mi ton, em uma área plantada de 24,2 milhões de hectares segundo a ABIOVE, (2012) e EMBRAPA, (2012). Para a safra 2011/12, a estimativa nacional é que a área cultivada com a oleaginosa seja de 24,63 milhões de hectares, o que corresponde a um aumento de 1,9% ou 453,7 mil hectares sobre a área semeada na safra passada. Entretanto, a produção nesta safra esta estimada em 71,75 mi ton, 4,7% (3,57 mi ton) menor que a produção da safra anterior quando foram colhidas 75,32 mi ton (CONAB, 2012).

2.2. O déficit hídrico e as perdas na produção

Apesar das grandes expectativas para a produção e comercialização da cultura da soja, o grão no campo está sujeito a diversos estresses abióticos e bióticos que afetam diretamente o seu crescimento e desenvolvimento. Dentre estes estresses, o déficit hídrico tem sido responsável por reduzir consideravelmente os rendimentos, especialmente durante a fase reprodutiva, resultando em perdas financeiras significativas aos produtores (EMBRAPA, 2005).

Na última década, a frequência de períodos de seca aumentou expressivamente no Brasil e em outros países Sul-americanos, fato provavelmente associado às mudanças climáticas globais (JICA, 2011). Os Estados do Sul do Brasil, por exemplo, responsáveis por 30% da produção nacional, foram muito afetados pela estiagem nos últimos anos, sendo que no Rio Grande do Sul, estado mais atingido pela seca, houve uma queda de 78% na produção da cultura na safra 2004/2005, segundo FARIAS NEUMAIER & NEPOMUCENO, (2009). Ainda neste estado, a estiagem levou a uma redução média de 22% na produtividade da safra 2007/2008, gerando prejuízos em torno de R\$ 1,6 bilhão (EMBRAPA, 2008). Em 2012, já se fala em um aumento de 10% no preço da soja devido à seca que ocorreu em parte do território nacional decorrente

do fenômeno La Niña, diminuindo em até 20% a produtividade no sul do país (CONAB, 2012).

Segundo avaliações preliminares feitas pelo governo paranaense e gaúcho, as perdas na economia podem chegar a R\$ 4 bilhões. Na América do Sul na também produtora de soja, Argentina, a previsão conforme projeções de consultorias privadas e de dados do governo, é que a quebra na safra do país pode ser três vezes maior que a brasileira, passando de 15 milhões de toneladas. De tal modo que, a safra de soja tende a cair, de 50 milhões para 45 milhões (t) além da perda em outras culturas de importância (JORNAL PORTAL DO PARANÁ, 2012).

Estes valores não estão isolados, e refletem negativamente na economia mundial. As cotações na bolsa de Chicago, referência para as *commodities* agrícolas, tendem a se elevar devido a esta menor participação da América do Sul nas exportações da soja (CONAB, 2012). Se consideradas as perdas indiretas relacionadas ao agronegócio como um todo e a economia nas regiões produtoras, essas perdas certamente têm grande impacto na sociedade (JICA, 2011). Dados mostram que de 1999/2000 a 2008/2009 mais de US\$ 18 bilhões foram perdidos na sojicultura em razão da seca.

2.3. Diferentes mecanismos de resposta das plantas ao déficit hídrico

Na natureza as plantas estão sujeitas a uma série de estresses ambientais que afetam seu desenvolvimento. De maneira geral as plantas se adaptaram aos “ataques” ambientais a níveis celulares, fisiológicos e bioquímicos, o que permite assim sua sobrevivência (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). Entretanto, embora as plantas tenham evoluído gradativamente com o intuito de lidar com os “ataques” do ambiente, este tipo de estresse ainda continua sendo a causa primária das perdas nas safras de importantes culturas em todo o mundo. O melhoramento vegetal convencional indica que a tolerância aos estresses abióticos como a seca é governada por múltiplos locus e, portanto, possui uma natureza multigênica, resultando em uma adaptação altamente complexa para a planta (AGARWAL & JHA, 2010).

O déficit hídrico é um dos principais fatores abióticos que afeta negativamente a produtividade global da soja. A falta de água durante o período de formação de flores pode diminuir o número de flores (abortamento), e durante a fase reprodutiva, a ausência de água é responsável por acelerar a senescência, diminuindo o período de enchimento de grãos e conseqüentemente a produtividade final (DESCLAUX & ROUMET, 1996).

O déficit hídrico atua ainda induzindo uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, como o fechamento dos estômatos, a diminuição do crescimento celular e da fotossíntese, e a ativação da respiração. Plantas em condições de seca também podem responder e se adaptar tanto a nível celular como molecular, acumulando osmólitos e proteínas especificamente envolvidas na tolerância ao estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Assim, em resposta ao estresse ambiental, as plantas ativam mecanismos de defesa de tal modo que, um grande número de genes são ativados e, conseqüentemente, um elevado número de proteínas são produzidas, ativando diferentes vias metabólicas, que resultam em um aumento da tolerância vegetal às condições adversas impostas, conforme descrito por MANALAVAN et al., (2009).

Os mecanismos de resposta vegetal ao déficit hídrico são classificados em três grandes grupos principais: escape, evitamento, e tolerância (TURNER et al., 2001). O escape à seca permite que a planta complete seu ciclo de vida antes do período de déficit hídrico acontecer. Este mecanismo é realizado quando a planta acelera o seu ciclo, ou seja, quando se trabalha com cultivares de plantio precoce.

O mecanismo de evitar a seca envolve estratégias que permitem à planta manter altos níveis de água durante o período de estresse, seja por uma boa eficiência de absorção de água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração na parte aérea. Desta forma, as plantas evitam a seca aumentando o teor relativo da água, utilizando menos água disponível, mantendo uma baixa condutância na epiderme e ainda diminuindo as trocas gasosas. Este mecanismo permite o desenvolvimento de raízes laterais mais moderadas e fibrosas e também o desenvolvimento de raízes principais mais profundas (MANALAVAN et al., 2009) (Figura 1).

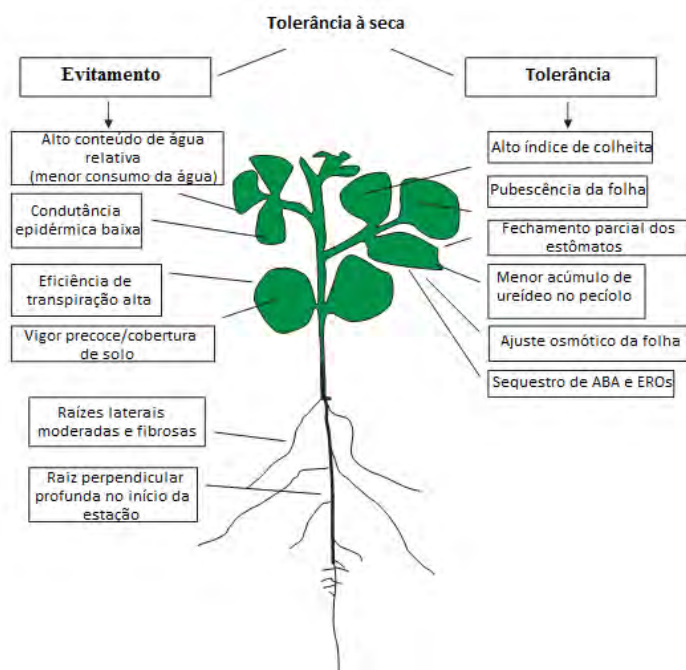


Figura 1. Características vegetais associados ao evitamento e à tolerância a seca em soja. Adaptado de MANALAVAN et al. (2009).

O terceiro mecanismo de defesa consiste na capacidade vegetal em tolerar a seca, o que permite à planta através da tolerância protoplasmática, ou da síntese de osmoprotetores ou solutos compatíveis, manter o turgor e continuar seu metabolismo mesmo em baixo potencial de água. Deste modo, a planta tolera a seca mantendo uma maior pubescência foliar, promovendo o fechamento parcial dos estômatos e um melhor ajustamento osmótico, diminuindo o acúmulo de ureídeos nas folhas, e eliminando o excesso do hormônio vegetal ABA e das espécies reativas de oxigênio, que são produzidas pelo estresse (MANALAVAN et al., 2009) (Figura 1). Para que esta resposta ocorra, proteínas denominadas fatores de transcrição atuam desencadeando cascatas gênicas que operam minimizando os danos causados pelo estresse hídrico.

2.4. Genes envolvidos na resposta vegetal ao déficit hídrico

Estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* e arroz mostram que, todas as alterações moleculares e fisiológicas que ocorrem nas plantas em resposta ao déficit hídrico resultam da ativação de uma variedade de genes com diversas funções, que podem ser induzidos ou reprimidos pelo estresse, sendo estes genes classificados em dois diferentes grupos de acordo com SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, (2007).

O primeiro grupo, incluem os genes funcionais que atuam no metabolismo celular e que, provavelmente, funcionam na tolerância ao estresse, como as proteínas chaperonas, proteínas *LEA*, osmotinas, proteínas anticongelantes, proteínas de ligação ao mRNA, assim, também, como as enzimas chaves na biossíntese de osmólitos, proteínas de canais de água, transportadores de açúcar e prolina, além das enzimas de desintoxicação e várias proteases.

O segundo grupo é composto por genes reguladores incluindo várias kinases, fosfatases, e genes do metabolismo de fosfolípidos, e também da biossíntese de ABA (ácido abscísico), além dos genes que codificam os fatores de transcrição como *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding – Elemento de ligação de resposta a desidratação*), *AREB* (*ABA Responsive Element Binding - Elemento de ligação de resposta ao ABA*), *MYC* (*Myelocytomatosis oncogene*), *MYB* (*Myeloblastosis oncogene*) *NAC* (*NAM, ATAF 1,2 e CUC*), *HB* entre outros. Estes genes reguladores atuam não somente na tolerância, mas também na regulação da expressão de genes e na tradução de sinais em resposta ao estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) (Figura 2).



Figura 2. Produtos gênicos envolvidos na tolerância ao estresse. Os produtos dos genes são classificados em dois grupos. O primeiro inclui as proteínas funcionais, e o segundo grupo contém as proteínas regulatórias. Adaptado de SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, (2007).

2.5. O papel do hormônio ácido abscísico (ABA) na sinalização do estresse vegetal

O ABA é um importante hormônio vegetal, responsável por desempenhar um papel crucial em uma variedade de processos de desenvolvimento e em resposta aos estresses adaptativos em plantas. Dada a sua importância, em plantas de *Arabidopsis*, por exemplo, o ABA regula a expressão de aproximadamente 10% dos genes que codificam proteínas, sendo este um percentual bem maior quando comparado com os demais hormônios vegetais (FUJITA et al., 2011).

Dentre suas variadas funções, quando as plantas se encontram sob condições de desidratação celular durante a maturação de sementes e em estágios de crescimento vegetativo, elas induzem um aumento endógeno do nível de ABA em suas células, e este atua melhorando a sobrevivência e produtividade das plantas através da ativação de fatores de transcrição, que atuam desencadeando cascatas gênicas que operam minimizando os danos causados pelo estresse (LIAO et al., 2008a).

Durante o déficit hídrico, o ABA atua diminuindo a taxa de transpiração e no controle do murchamento, além de promover o fechamento dos estômatos nas células guardas, e controlar o fluxo de solutos nas células (AGARWAL & JHA, 2010); (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006).

Estudos mostram, que a expressão dos genes de resposta ao ABA é principalmente regulada por duas diferentes famílias de fatores de transcrição, pertencentes a classe dos *bZIP* (*Basic Leucine Zipper* – zíper de leucina básico), sendo o FT *ABI5* (*ABA insensitive 5*) responsável por controlar a expressão de genes de resposta ao ABA em sementes e o FT *AREB/ABFs* (*ABA Responsive Element Binding / ABA binding*) responsável por controlar a expressão de genes de resposta ao ABA no estágio vegetativo (FUJITA et al., 2011).

O controle dos fatores de transcrição, que mediam a expressão dos genes ABA regulados, é realizado por receptores, mensageiros secundários, proteínas quinases, fosfatases e fatores de remodelamento da cromatina. E ainda, a segmentação de

miRNA, a maturação e estabilidade do mRNA e a degradação de proteínas parecem também modular a expressão de genes ABA regulados (FUJITA et al., 2011).

Pesquisas integrando conjuntos de dados de transcriptoma e metaboloma revelam que, a regulação da transcrição ABA dependente induzido por seca, desempenha um papel fundamental no metabolismo de carboidratos e na biossíntese da cadeia ramificada de aminoácidos, como a prolina, sacaropina e amina (FUJITA et al., 2011). Interessantemente, a expressão de muitos genes regulados por ABA parece oscilar robustamente durante o dia.

Estudos têm mostrado, que o ABA é acumulado no período diurno para controlar o período circadiano de luz de maneira dependente. Estes dados estão de acordo com a observação de que o fator de transcrição *bZIP HY5 (Long Hypocotyl 5)*, um mediador positivo de genes regulados pela luz, integra as vias de sinalização de ABA e de luz, parcialmente através da ativação direta de *ABI5* segundo descrito por CHEN et al., (2008). Recentemente, o gene *TOC1 (Timing of Cab 1)* foi identificado como um “interruptor” molecular que liga o relógio circadiano, ativando a transcrição mediada por ABA em respostas ao estresse de seca (LEGNAIOLI et al., 2009). Em adição, 68% dos genes regulados pelo relógio circadiano são também ativados em resposta à estresses (KREPS et al., 2002). Coletivamente, essas observações apoiam a visão de que, o relógio circadiano media a capacidade de uma planta em se adaptar às mudanças diárias de estado da água, controlando níveis endógenos de ABA e, posteriormente, a expressão gênica em resposta a este hormônio conforme descreve FUJITA et al., (2011).

2.5.1 Características dos genes induzidos por ABA: a sequência ABRE

Muitos genes regulados por ABA, possuem em sua região promotora um elemento conservado cis atuante, denominado ABRE (PyACGTGG/TC) (*ABA Binding Responsive Element*). É através do reconhecimento desta sequência ABRE pelos fatores de transcrição, que a expressão dos genes de resposta ao estresse é ativada (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006).

Essa sequência pertence à família G-box (CACGTC) e foi inicialmente identificada no gene *EM* em trigo, o qual funciona principalmente em sementes na embriogênese tardia. No arroz, essa sequência está presente no gene *RAB16*, expresso tanto em tecido vegetal como nas sementes sendo que, nas sementes atua principalmente no processo de maturação.

A sequência ABRE, possui um núcleo de nucleotídeos ACGT reconhecido pela classe dos FT *bZIP* em plantas. No entanto, sabe-se que, uma única cópia da sequência ABRE não é suficiente para induzir a ativação da transcrição de genes mediados por ABA. Dessa forma, para que a expressão de genes induzido por ABA ocorra, mais de uma cópia da sequência ABRE ou de outros elementos complementares são necessárias. Entretanto, parece que, estes motivos precisam estar localizados perto do sítio de início da transcrição dos genes para que então, possam ser ativados (FUJITA et al., 2011). Vários tipos de sequências ABREs têm sido relatadas, incluindo a sequência G-box (CACGTC) e os elementos complementar (CGCGTG), *CE1*, *CE3*, *DRE/CRT* (Dehydration-Responsive Element/C-Repeat), hex3 e o motivo III (FUJITA et al., 2011). Todos estes elementos isolados com diferentes tipos de sequências são reconhecidos pelas proteínas *bZIPs*, (FOSTER et al., 1994); (BUSK & PAGES, 1998).

Os genes induzidos por ABA compreendem as proteínas associadas ao estresse e a tolerância, como as proteínas LEA, proteínas regulatórias como os fatores de transcrição, quinases, fosfatases e uma variedade de transportadores e enzimas envolvidas na síntese de osmoprotetores, sinalização de fosfolípídeo, metabolismo celular de ácidos, carboidratos e do metabolismo secundário. Por outro lado, os genes reprimidos por ABA são aqueles enriquecidos por proteínas que codificam para crescimento e desenvolvimento, tais como as proteínas ribossomais, cloroplastos, proteínas de parede celular e as proteínas da membrana plasmática (FUJITA et al., 2011).

2.6. Proteínas *bZIPs* e os fatores de transcrição *AREBs/ABFs*

No geral, os fatores de transcrição são proteínas que desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos. Eles atuam como chaves regulatórias envolvidas nas etapas iniciais de expressão, regulação gênica e na transdução de sinais, em resposta aos estresses ambientais. Estruturalmente, eles são classificados de acordo com os seus domínios de ligação ao DNA. Os FTs *bZIP* por exemplo, encontram-se presentes em todos os eucariotos e são compostos por dois domínios de ligação ao DNA, sendo o primeiro formado por uma região básica com aproximadamente 16 aminoácidos, que atua como uma região de sinalização nuclear, responsável pela ligação específica do fator de transcrição ao DNA. O segundo domínio, é formado por um zíper de leucina composto por repetições de sete leucinas ou de outros aminoácidos hidrofóbicos, posicionados exatamente a nove aminoácidos em relação ao domínio C-terminal, formando uma hélice anfipática responsável pela dimerização (JAKOBY et al., 2002) (Figura 3A).

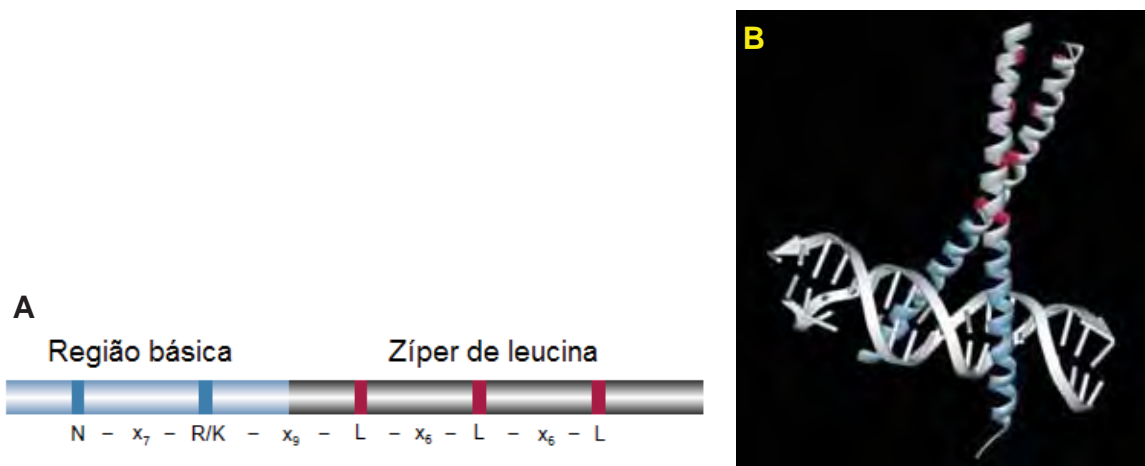


Figura 3. Em A, estrutura primária de um domínio *bZIP*, a região básica está sombreada em azul e as caixas azuis e vermelhas são regiões altamente conservadas. Em B, a estrutura tridimensional do domínio *bZIP* GCN4 ligado ao DNA. Os resíduos de leucina estão posicionados um de cada lado da hélice em vermelho por interação de van der Waals. Adaptado de JAKOBY et al., (2002).

Para que a ligação do FT ao DNA ocorra, duas subunidades do FT *bZIP* contendo os resíduos de leucina devem se ligar via interação, formando uma estrutura chamada zíper (Figura 3B).

Entre os membros da família dos FT *bZIPs*, vários deles podem ligar-se ao domínio conservado ABRE (PyACGTGGC), presentes nas regiões promotoras de vários genes regulados por ABA. No genoma de *Arabidopsis*, cerca de 77 a 80 fatores de transcrição *bZIPs* já foram identificados e divididos em 13 grupos (do grupo A ao L, e S) de acordo com seus domínios *bZIPs*, e similaridades entre os domínios conservados, (CORRÊA et al., 2008). A análise de alguns destes fatores mostrou que, eles atuam regulando diversos processos biológicos, como a defesa contra patógenos, luz, sinalização de estresse, maturação de sementes e no desenvolvimento de flores, (JAKOBY et al., 2002).

No genoma da soja, 176 fatores de transcrição *bZIPs* já foram identificados e nomeados como *GmbZIPs*, mas somente 05 estão caracterizados de acordo com SCHMUTZ et al., (2010). Os fatores de transcrição *bZIPs*, *GmbZIP44*, *GmbZIP62* e *GmbZIP78*, pertencem aos subgrupos S, C e G, respectivamente, e funcionam como reguladores negativos na sinalização ABA, conferindo tolerância à salinidade e ao frio em plantas de *Arabidopsis* transgênicas (LIAO et al., 2008a). O quarto fator de transcrição isolado, foi o *GmbZIP132*, induzido por tratamentos de seca e alta concentração salina, podendo estar mais relacionado à dormência de sementes, uma vez que, uma maior expressão gênica deste fator foi detectada em cotilédones por LIAO et al., (2008b). Em 2011, GAO e colaboradores isolaram um quinto e novo fator *bZIP* nomeado *GmbZIP1*. Análises funcionais mostraram que plantas de *Arabidopsis* super-expressando *GmbZIP1* ativaram o fechamento estomático e diminuíram a perda de água não somente sob estresse hídrico, mas também, sob condições de estresse com ABA e sal. Filogeneticamente, *GmbZIP1* é um ortólogo muito próximo de *AtAREB1/AtABF2*, um FT *bZIP* de *Arabidopsis* pertencente ao grupo A.

2.6.1. Fator de transcrição AREB/ABF

A subfamília dos fatores de transcrição *bZIP AREB/ABF* (*ABA Responsive Element Binding / ABA Binding Factor*), já foi isolada em várias espécies vegetais como *DPBF* em girassol, (KIM et al., 1997); *TRAB1* em arroz, (HOBBO et al., 1999); *PKABA1*

em trigo, (JOHNSON et al., 2002); *HvABI5* em cevada (CASARETTO & HO, 2003) e recentemente *SIAREB* em tomate (HSIEH et al., 2010) e *GmbZIP1* em soja (GAO et al., 2011). Estes FTs, possuem um domínio básico de ligação ao DNA compostos de vinte aminoácidos na região N terminal, e um domínio zíper de leucina, composto de sete aminoácidos na região C terminal, que formam uma estrutura denominada dupla hélice com o DNA e podem interagir com elementos específicos *cis* atuante de resposta ao ABA (ABRE- Py-ACGTGG/TC), ativando os genes de resposta ao estresse (GUILTINAN et al., 1990); (HOBO et al., 1999); (HATTORI et al., 2002).

Em *Arabidopsis*, a subfamília *AREB/ABF/ABI5/DPBF* consiste de 9 membros homólogos, identificados como: *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4*, *AREB3/DPBF2*, *ABF1*, *ABF3/DPBF5*, *ABI5/DPBF1*, *EEL/DPBF4*, *DPBF2*, e *AT5G42910*. Estes, pertencem ao grupo A dos 13 grupos identificados. Os 9 membros, possuem três domínios conservados N-terminal (C1, C2 e C3), e um domínio conservado C terminal (C4), além de um domínio básico de ligação *bZIP* (BENSMIHEN et al., 2002); (KIM et al., 2002); (SUZUKI et al., 2003), (Figura 4).



Figura 4. Estrutura da família de proteínas *AREB*. Adaptado de FUJITA et al. (2005).

Estudos realizados em *Arabidopsis*, para identificar se os 9 membros da subfamília *AREB* estavam envolvidos com o ABA na via de tradução de sinal sob condição de seca, mostraram que, somente a expressão de três genes *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* e *ABF3/DPBF5* foi induzido por seca, alta salinidade e tratamento com ABA exógeno nos tecidos vegetativos, mas, não em sementes, mostrando que membros de um mesmo grupo podem ter padrões de expressão similares e compartilhar funções (FUJITA et al., 2005). Uma análise realizada com os três genes revelou que, uma maior quantidade de mRNA do gene *AREB1/ABF2* foi acumulada sob condições de desidratação, sugerindo que este gene possa ser uma chave regulatória

na sinalização de ABA nesta condição de estresse (FUJITA et al., 2005). Em contraste, uma maior quantidade de mRNA referentes aos genes *AREB2/ABF4* e *ABF3/DPBF5* foi acumulada sob condições de alta salinidade (UNO et al., 2000).

Análises posteriores *in vivo* mostraram que, o FT *AREB1/ABF2* está localizado no núcleo das células e pode ser expresso constitutivamente nas raízes, tecidos vasculares de folha e hidatódios e em todos os tecidos sob condição de estresse hídrico e salino e que, *AREB1* é responsável por dirigir a expressão de genes reguladores induzidos por ABA e pela seca tais como os genes *H1S-3*, *AIA1*, *GBF3*, *RD20* bem como de genes da embriogênese tardia e genes da classe (*LEA*) envolvidos na resposta a estresses (FUJITA et al., 2005), (Figura 5).

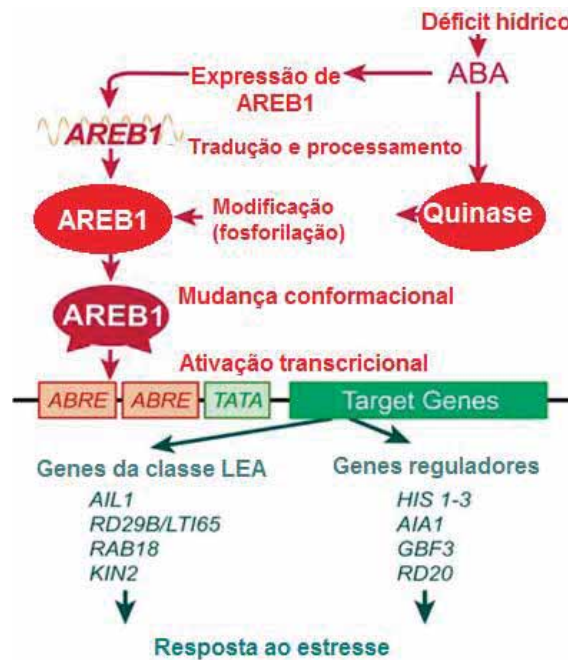


Figura 5. Ilustração da via de sinalização de ABA para o fator de transcrição *AREB1*. Durante o déficit hídrico, o nível do ABA aumenta nas plantas e este atua causando modificações pós transcricional no fator de transcrição *AREB1*. Este fator é fosforilado e com isso sofre mudanças conformacionais necessárias para a ativação da expressão de genes de resposta ao estresse como os genes da classe LEA e genes reguladores. Adaptado de FUJITA et al., (2005).

Plantas transgênicas de *Arabidopsis*, superexpressando o gene *AREB1* sob controle do promotor constitutivo 35S, não apresentaram diferenças no fenótipo quando comparadas com plantas selvagens crescidas em meio ágar (FUJITA et al., 2005). Estes resultados mostraram que, a expressão constitutiva do gene *AREB1* em

condições normais de crescimento por si só, não é suficiente para ativar genes de resposta ao estresse como o *RD29B*. Para examinar esta possibilidade, o nível de mRNA do gene *RD29B* foi monitorado em plantas transgênicas contendo a construção *35S-AREB1* em diferentes tempos de tratamento com, e sem a aplicação de ABA exógeno. Os resultados confirmaram que, a expressão constitutiva de *AREB1* não ativou a expressão do gene *RD29B* na ausência do ABA exógeno, no entanto, duas horas após a aplicação de ABA, o gene *RD29B* foi expresso nas plantas GMs, o que não ocorreu nas plantas selvagens. Estes resultados indicam que, não somente a presença de *AREB1* em plantas, mas também a adição exógena de ABA é requerida para que esse fator de transcrição ative a expressão de genes de resposta ao estresse (FUJITA et al., 2005). Sabe-se hoje, que o hormônio ABA atua induzindo modificações fundamentais em *AREB1*, para que assim, este ative a expressão de genes de resposta ao estresse como o *RD29B* (FUJITA et al., 2005), (Figura 5).

As modificações em *AREB1* ocorrem da seguinte maneira: fosfatases e quinases promovem efeito regulatório opostos na via de sinalização de ABA. Na ausência de ABA, por exemplo, a fosfatase *PP2C* atua como um regulador constitutivo negativo da família de quinases *SnRK2*, cuja autofosforilação é requerida para que esta ative a expressão de genes alvos. Na presença do ABA, o hormônio se liga a um receptor, e reprime a atividade da fosfatase *PYR/PYL/RCAR*. O sequestro da fosfatase *PP2C* por ABA, permite a autoativação da quinase que posteriormente irá fosforilar o fator de transcrição, facilitando assim a transcrição dos genes de resposta a ABA. A etapa crucial dessa via de sinalização de ABA é a percepção de ABA pelas proteínas fosfatases *PYR/PYL/RCAR*, e a subsequente inibição da fosfatase *PP2C* pela ligação de ABA ao seu receptor (SHEARD & ZHENG, 2009), (Figura 6).

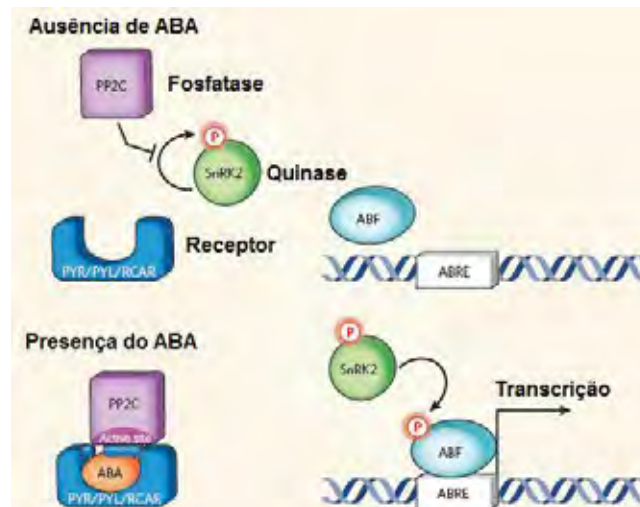


Figura 6. Ilustração da via de sinalização de ABA. A fosforilação dos fatores de transcrição ocorre na presença de ABA que atua inibindo a fosfatase *PP2C*. Esta, permite que a quinase *SnRK2* fosforile o fator de transcrição *ABF* (*bZIP*) e esta forma ativa então a expressão dos genes de resposta ao estresse. Adaptado de SHEARD & ZHENG, (2009).

2.6.2. *AREB1ΔQT* - a forma constitutivamente ativa de *AREB1*

Com a finalidade de descobrir o possível domínio de ativação transcricional de *AREB1*, FUJITA et al., (2005) construíram uma série de plasmídeos efetores contendo deleções na região N-terminal dessa proteína. Este estudo, revelou que, pequenas deleções na região P N-terminal de *AREB1* resultam em uma significativa diminuição na transativação do gene repórter em protoplastos, tratados com e sem ABA, sugerindo a presença de um domínio positivo regulatório nesta região. Para confirmar esta hipótese, plasmídeos efetores foram construídos e acoplados a domínios de ligação ao DNA de levedura (*GAL4*), juntamente com as regiões N-terminal PQ, P e R de *AREB1*. Os plasmídeos foram inseridos em protoplastos de *Arabidopsis* e os resultados mostraram que, os plasmídeos *GAL4-PQ* e *GAL4-P* fundidos as respectivas regiões de *AREB1* ativaram o gene repórter *GUS*, confirmando que a região P N-terminal de *AREB1* funciona como um domínio de ativação transcricional mesmo em combinação com domínio não nativo de ligação de DNA (FUJITA et al., 2005). Neste mesmo estudo, foi analisado se proteínas mutantes de *AREB1* contendo a região P e seu domínio nativo de ligação ao DNA *bZIP* eram capazes de ativar o gene repórter *RD29B-GUS* sem o

tratamento com ABA. Duas construções mutantes contendo deleções internas, nomeadas de *AREB1ΔQT* e *AREB1ΔP/RT* foram sintetizadas. A construção *AREB1ΔQT*, possuía o domínio conservado P (ativador transcricional) da região N-terminal, mais o domínio nativo de ligação ao DNA *bZIP*, enquanto que a construção *AREB1ΔP/RT* possuía o domínio conservado Q da região N-terminal, mais o domínio nativo de ligação ao DNA *bZIP* (Figura 7).

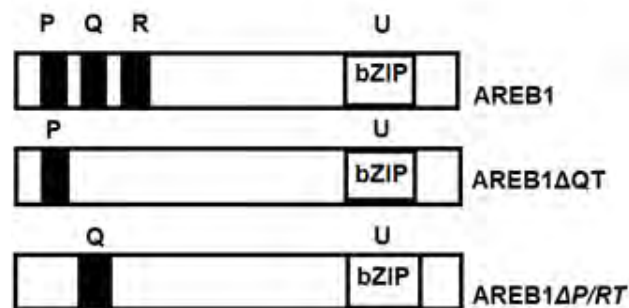


Figura 7. Construções dos mutantes de *AREB1* geradas com suas respectivas deleções nos domínios conservados da região N-terminal de *AREB1*. Adaptado de FUJITA et al., (2005).

Ambas as construções mostraram diferentes respostas na transativação do gene repórter *GUS*. No entanto, a forma *AREB1ΔQT* apresentou um significativo aumento na ativação do gene repórter na ausência de ABA, ao contrário da forma *AREB1ΔP/RT*, que não ativou o gene *GUS*. Este resultado mostrou que, a construção *AREB1ΔQT* pode então ser considerada uma forma constitutivamente ativa de *AREB1* (FUJITA et al., 2005).

Como esperado, plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando a construção *35S-AREB1ΔQT* induziram à expressão de genes de resposta ao estresse como o *RD29B* mesmo na ausência de ABA, diferentemente do gene *AREB1* completo, sem deleção, que necessita do hormônio para que modificações pós transcricionais ocorram e então a ativação da transcrição de genes estresse-responsivos. As plantas contendo a construção *35S-AREB1ΔQT*, foram relativamente menores quando comparadas com as plantas selvagens, e análises de microarranjo realizadas para avaliar diferentes perfis de expressão em duas linhagens *35S-AREB1ΔQT* independentes, mostraram a expressão de proteínas da classe *LEA*, e a ativação da via

de transdução de sinal ABA dependente em condições não estressadas. Estas plantas, apresentaram, no entanto, hipersensibilidade ao ABA após o período de germinação, enquanto que as plantas selvagens cresceram normalmente em teste de sensibilidade a ABA. As plantas transgênicas *35S-AREB1ΔQT* apresentaram ainda uma maior tolerância à seca quando comparadas com as plantas selvagens, após o tratamento seguido de reidratação, (FUJITA et al., 2005).

A partir destes estudos pode-se concluir que, a construção *AREB1ΔQT* permite a ativação constitutiva da transcrição de genes de resposta ao estresse mesmo na ausência de ABA, e do estresse, sugerindo que, a região deletada funciona como um domínio regulador em resposta a este hormônio.

A deleção, resultou em um efeito negativo na ligação dos fatores de transcrição endógenos aos motivos ABRE, da região promotora do plasmídeo repórter, pois, a forma mutante se tornou hipersensível a ABA. Assim, o uso desta construção parece suplantar a necessidade de modificações ABA dependente, requerida no caso do gene *AREB1* completo, sem deleção. A mudança conformacional gerada pela deleção interna, pode estar associada com a exposição de um domínio de ativação, mascarado no complexo normal. Tomado em conjunto, estes resultados indicam que, as modificações induzidas por ABA, tal como a fosforilação dos domínios conservados, pode contribuir na função do domínio de transativação da região N-terminal de *AREB1*, através de uma modificação conformacional ao invés de, ativar seu próprio domínio de transativação N-terminal, mascarando assim o seu efeito (FUJITA et al., 2005).

Neste contexto, estudar a funcionalidade da forma constitutivamente ativa *AREB1ΔQT* em soja é importante, pois, sabe-se que este gene apresenta um grande potencial em aumentar a tolerância ao déficit hídrico em plantas, um dos principais fatores que afetam a produção da soja atualmente. O uso da forma constitutivamente ativa do gene *AREB1*, permitirá caracterizar se os mesmos mecanismos de regulação desses genes via ABA ocorre em soja.

2.7. Transformação genética em soja

Devido à sua posição de destaque em todo o mundo, a soja tem sido alvo constante de estudos de melhoramento genético. No entanto, umas das principais causas de perdas na produção é o déficit hídrico, característica considerada muito complexa, sendo difícil a obtenção de culturas mais tolerantes utilizando processos de melhoramento genético convencional. No entanto, com o advento da biotecnologia, muitas características do grão puderam e ainda podem ser melhoradas através da produção dos chamados organismos geneticamente modificadas (OGMs), que representam atualmente uma das mais rápidas inovações tecnológicas adotadas na história da agricultura (EAPEN, 2008).

As ferramentas biotecnológicas, oferecem uma vantagem significativa quando comparadas com programas de melhoramento, pois, permitem a realização de estudos moleculares, genéticos, bioquímicos e fisiológicos em plantas transgênicas, com objetivo de entender as diferentes respostas moleculares vegetal, durante o período de estresse, através de estudos de superexpressão e silenciamento de genes, entre outros (WIEBKE-STROHM et al., 2011). É importante ressaltar que, estratégias de manejo como plantio direto, irrigação (quando disponível e considerando-se o custo), adubação e outras formas de gerenciar o desenvolvimento das culturas sob condições de estresse hídrico, devem estar aliadas ao uso das ferramentas biotecnológicas.

Dentre as várias estratégias biotecnológicas que vem sendo aplicadas na sojicultura, nos últimos anos, o uso de fatores de transcrição como o *NAC* (*NAM*, *ATAF 1,2* e *CUC*) e o *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding* – Elemento de ligação responsivo à desidratação) ou *CBF* (*C-repeat Binding Factor* – Fator de ligação à repetições C), (TRAN et al., 2009); (HAO et al., 2011); (POLIZEL et al., 2011) se encontra em fase de testes para prova de conceito. Estes fatores se ligam a vários genes, ativando um conjunto de vias responsivas ao estresse, que juntas resultam em adaptações fisiológicas/moleculares que permitem às células vegetais, se adaptarem às situações ambientais desfavoráveis, conferindo tolerância (HUSSAIN et al., 2011).

Os fatores de transcrição podem ser introduzidos no tecido alvo por diferentes métodos, no entanto, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e a

biobalística, têm sido os dois métodos mais amplamente utilizados na transformação genética de plantas.

Os primeiros trabalhos de transformação por bombardeamento de partículas, utilizaram meristemas apicais, e culturas embriogênicas em suspensão, (MCCABE et al., 1988); (FINER & MCMULLEN, 1991). Pelo sistema de transferência mediada pela *Agrobacterium*, já foram utilizados como alvos cotilédones imaturos, (PARROT et al., 1989), (YAN et al., 2000), culturas embriogênicas em suspensão, (TRICK & FINER, 1998) e tecido meristemático axilar, localizado em nodos cotiledonares de plântulas (HINCHEE et al., 1988). No entanto, o sucesso dos métodos de transformação em soja, não tem correspondido às expectativas, devido à baixa eficiência de transferência de genes e, principalmente, das dificuldades relacionadas ao processo de regeneração de plantas *in vitro*, principal limitação para a obtenção de soja GM (TRICK et al., 1997); (DROSTE et al., 2001).

Algumas pesquisas já foram desenvolvidas, visando desenvolver protocolos eficientes de transformação para a cultura da soja. Um trabalho realizado por RECH et al., (2008), mostrou que, a biobalística, combinada com um sistema marcador de seleção (gene *ahas*), com o emprego de um herbicida translocável e a indução de multibrotamento em meio de cultura, resultou em um significativo aumento na recuperação de plantas transgênicas férteis de soja, feijão e algodão, e ainda, uma eficiência de transformação de 9% para soja foi alcançado, valor considerado alto para essa cultura. WIEBKE-STROHM et al., (2011), revelaram também que já é possível produzir plantas transgênicas férteis de soja derivadas de embriões somáticos, transformados pela combinação da técnica de biobalística com o sistema de *Agrobacterium*. Neste estudo, ferimentos microscópicos foram causados em embriões somáticos pela técnica de biobalística, utilizando partículas de tungstênio livre de DNA e a seguir, os embriões foram inoculados pela *Agrobacterium*. PCRs e análises de *Southern blot* confirmaram a integração dos transgenes no genoma das plantas, que foram posteriormente confirmadas como férteis.

Apesar de ainda haver muitas especulações sobre seu efeito na saúde e no ambiente, a tecnologia GM vem aos poucos ganhando espaço. Em 2008, a área

cultivada com transgênicos, a nível mundial, variou de menos de 5 a 125 milhões de hectares, sendo as culturas com maior área cultivada a soja, o milho, o algodão e a canola. Entre os 25 países que possuem culturas transgênicas comerciais, as maiores áreas plantadas estão nos Estados Unidos, Argentina e Brasil. Em nosso país, a primeira cultura a ser liberada para cultivo comercial foi à soja tolerante a herbicida, em 1998. A partir de 2005, mais onze diferentes linhagens de milho e seis de algodão GM foram liberados para uso comercial. Entre 2009 e 2010, três diferentes linhagens de soja também foram liberadas para uso comercial, sendo todas elas tolerantes a herbicidas. Entretanto, todos os requerentes para estas liberações foram empresas multinacionais, ou seja, o Brasil possui a terceira maior área cultivada com cultura transgênica, porém, nenhum desses materiais genéticos foi gerado por tecnologia nacional, apenas mostrando que o aumento da área GM cultivada, não reflete necessariamente em avanço tecnológico (LAU, 2009). Por esse motivo, é de fundamental importância o investimento nacional em pesquisas visando à produção das novas culturas GMs, para que, no futuro, nosso país seja mais competitivo mundialmente (LAU, 2009).

Por outro lado, é importante destacar que o Brasil tem estado à frente de inúmeros progressos científicos, gerando crescimento não somente no setor tecnológico, mas por extensão, também no setor econômico (PETHERICK, 2010). Dentre as políticas que levaram nosso país a esta posição de destaque, se encontra a Nova Lei de Biossegurança (Lei 11.105/05), que regulamenta a pesquisa e a liberação comercial de OGMs, desde que observadas todas as avaliações de risco e tomadas as devidas precauções de biossegurança. No entanto, se comparado a outros países que desenvolvem pesquisa de ponta, nosso país ainda apresenta significativo atraso.

2.8. Caracterização molecular dos eventos transgênicos

2.8.1 Número de cópias, inserção e zigosidade

A caracterização molecular de um evento transgênico é tão importante quanto a sua obtenção. Os transformantes primários devem ser analisados, pois, o DNA exógeno é inserido aleatoriamente no genoma vegetal, e muitas vezes plantas com múltiplas cópias do transgene são geradas, sendo estas, integradas em um ou mais locais nos cromossomos (WENG et al., 2004).

O número de cópias do transgene pode ser definido como a quantidade de DNA exógeno inserido na planta transformada, ou seja, quantas cópias da construção de interesse foram inseridas na planta. A quantificação do número de cópias pode ser detectada por dois diferentes métodos, a qPCR (quantitativo PCR), e o *Southern blot*.

Quando se utiliza a qPCR, este método fornece os resultados em números, que nada mais é que, a quantidade de transgene (que será devidamente interpretada para número de cópias) inserido na planta em relação a um calibrador endógeno.

Por outro lado, o método de *Southern blot*, fornece os resultados em bandas em gel de agarose, e esta técnica, pode medir tanto o número de cópias, como o número de inserções. As bandas geradas são amplificadas, de acordo com a enzima de restrição, que é utilizada no processo de digestão do DNA genômico da planta, e também de acordo com a especificidade da sonda, na qual é marcada com radioativo.

A escolha da enzima de restrição varia de acordo com o mapa do plasmídeo onde está inserido o gene de interesse. Quando se utiliza duas enzimas de restrição, para cortar em local específico do transgene dentro do genoma receptor, neste caso chamamos a banda gerada de cópia, pois, o fragmento gerado corresponderá a uma cópia do transgene. Entretanto, quando se utiliza apenas uma enzima de restrição, para cortar o DNA genômico, o resultado gerado é dito como inserção, pois, a enzima corta gerando fragmentos de diversos tamanhos. Isso acontece, devido não somente à presença de sítios de corte para o gene alvo, mas também pela presença de sítios ao longo do genoma da planta, que também são reconhecidos pela enzima. Assim, quando se utiliza uma única enzima de restrição, é possível detectar mais de uma cópia dentro de uma mesma inserção. Com isso, diversos fragmentos são gerados, nos mais diversos tamanhos, dependendo da distância entre os sítios de corte da enzima dentro do genoma da planta. Por isso, o número de inserções gerados deve ser analisados de

acordo com os resultados obtidos via qPCR, pois assim, os dados são interpretados de maneira mais precisa.

O uso do termo inserto e cópias muitas vezes pode gerar confusão, pois, os termos podem ser considerados equivalentes ou diferentes, dependendo dos dados obtidos, e principalmente se considerado outro conceito, o de zigosidade.

O termo zigosidade nas plantas está intimamente relacionado ao número de cópias. Por exemplo, as plantas transformadas T_0 são chamadas heterozigotas ou hemizigotas, pois, o transgene se insere em somente um dos cromossomos homólogos, podendo mais de uma cópia integrar-se no mesmo locus ou em loci diferentes, como também em cromossomos diferentes. Entretanto, se uma planta T_0 com duas cópias identificadas via qPCR possuir também dois insertos ou duas sequências do transgene identificados via *Southern blot*, neste caso específico, os termos inserto e cópias terão o mesmo significado. Por outro lado, se uma planta T_0 com duas cópias identificadas via qPCR possuir um inserto identificado via *Southern blot*, neste caso específico, os termos inserto e cópias não terá o mesmo significado, pois, dentro de uma inserção foi verificado mais de uma cópia.

Nas próximas gerações, após o processo de autofecundação, o transgene passa a segregar diferentemente. Neste momento, os termos inserto e cópia devem também ser usados com cautela. Por exemplo, uma planta T_0 hemizigota, com dois insertos e (duas cópias), após a autofecundação, pode ter cinco possíveis números de inserções: 0, 1, 2, 3 e 4, se não houver duplicações e rearranjos. Os resultados de qPCR pelo método $2^{-\Delta Ct}$ para esta geração, revelaria nenhum transgene (0), metade (1), o mesmo (2), um e meio (3) ou duas vezes (4) mais quantidade de transgene do que o calibrador endógeno com uma cópia (BUBNER & BALDWIN., 2004). Assim, para que os resultados possam ser bem interpretados, os resultados de *Southern blot*, qPCR e também da segregação a partir da geração T_2 , devem ser correlacionados.

Neste contexto, uma planta homozigota T_1 com quatro cópias possuirá 2 insertos, um inserto em cada cromossomo homólogo, podendo estar no mesmo locus ou em loci separados (Figura 8A). Por outro lado, se uma única inserção do DNA exógeno existir no mesmo alelo dos cromossomos homólogos, esta planta é

considerada uma linha transgênica homocigota com duas cópias do transgene e um inserto (Figura 8B). Contudo, se uma única inserção do DNA exógeno integrar em somente um dos dois cromossomos homólogos, esta planta é então considerada heterocigota ou hemizigota, com uma cópia do transgene (Figura 8C).

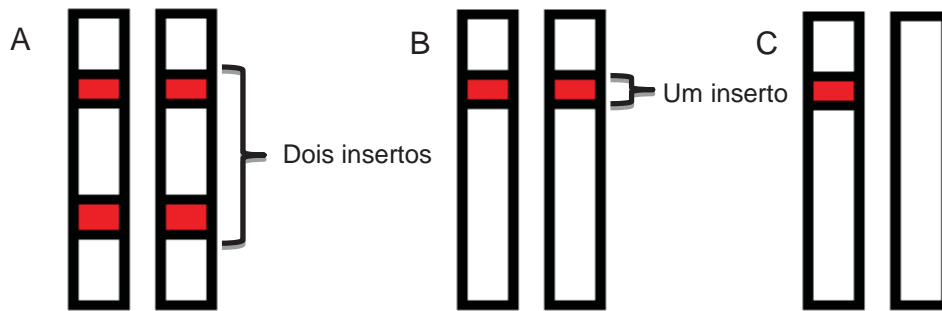


Figura 8. Em A: planta T₁ homocigota com quatro cópias e dois insertos. Em B: planta T₁ homocigota com duas cópias e um inserto. Em C: planta T₁ hemocigota ou heterocigota com uma cópia e um inserto.

Por fim, ainda existe a possibilidade da integração de múltiplas cópias em tandem (truncadas ou completas) dificultando ainda mais a interpretação dos dados. Cabe ressaltar que esta interpretação se aplica apenas para plantas diploídes, como a soja ($2n=4x=40$). Pelas razões apresentadas, para afirmar com exatidão o número de cópias inseridas em uma linhagem GM, é de grande importância, conhecer a zigosidade do evento gerado e analisar a segregação do transgene em gerações posteriores, juntamente com dados de *Southern blot* e/ou qPCR.

Neste trabalho, o termo inserto foi escolhido para ser utilizado quando na análise pela técnica de *Southern blot*, pois, utilizamos uma única enzima que corta na região promotora do gene alvo *AREB1ΔQT*. Assim, o termo cópia, foi utilizado somente após devidas análises dos resultados gerados pela técnica de qPCR.

2.8.2. Técnicas para quantificação do transgene inserido

O método mais comumente utilizado para determinar o número de cópias e insertos em plantas, é a técnica de *Southern blot*. Esta técnica consiste em digerir o

DNA genômico vegetal com enzimas de restrição específicas. O material digerido é então hibridizado com uma sonda de DNA radioativo correspondente ao transgene. Após a análise do resultado final, o número de bandas geradas corresponde ao número de cópias ou insertos do transgene por genoma haploíde, dependendo do sítio de corte da enzima escolhida (BHAT & SRINIVASAN, 2002). Apesar de essa técnica ser bastante confiável, esta consiste em um método bastante trabalhoso e demorado, além de requerer grande quantidade de material biológico para sua realização. Ainda, caso ocorra à perda do sítio de restrição da enzima, o número de bandas não corresponderá à quantidade de cópias do transgene (BUBNER & BALDWIN, 2004).

Para superar as restrições da técnica de *Southern blot*, a técnica de qPCR pode ser utilizada como complemento à análise. Através desse método é possível avaliar o nível de expressão do transgene, bem como sua zigosidade e o número de cópias. Esta técnica apresenta algumas vantagens, como requerer pequenas quantidades de material biológico, ser um método automatizado, altamente específico e sensível, que possibilita analisar rapidamente uma grande quantidade de plantas transformadas (BUBNER & BALDWIN, 2004).

A técnica funciona essencialmente da mesma maneira que uma PCR convencional, no entanto, na qPCR o aumento nas quantidades de material amplificado é registrado em tempo real ao longo da fase exponencial, e não somente ao final da reação. Para isto, fluoróforos que emitem fluorescência são utilizados na detecção do produto final. A fluorescência gerada durante a reação de qPCR é registrada, e o resultado é dado em relação ao ponto chamado *threshold cycle* (Ct), que consiste no ponto onde a reação atinge o limiar da fase exponencial, ou seja, o ponto onde se detecta o produto final da reação gerado pela fluorescência emitida. O Ct, permite a quantificação exata e reprodutível, baseado na fluorescência do número de cópias inseridas do transgene (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Dentre as metodologias disponíveis para realizar a reação de qPCR, os ensaios com *TaqMan*, (HOLLAND et al., 1991), são considerados os de maior confiabilidade, pois, utilizam uma sonda de DNA fluorescente que se hibridiza especificamente à sequência alvo entre os iniciadores *forward* e *reverse* garantindo uma eficiência de

aproximadamente 60% de anelamento, e amplificação do gene alvo. Outra metodologia muito utilizada, é o agente intercalante *Sybr Green*[®]. Este fluoróforo (*dye*) possui alta afinidade pela molécula de fita simples de DNA, emitindo pouca fluorescência em solução, mas quando ligado ao DNA fita dupla, emite um forte sinal (luz). Assim, com o acúmulo do produto amplificado na PCR, a fluorescência aumenta proporcionalmente, e então é detectada. É um método simples e econômico, pois não necessita da síntese de sondas específicas, além de ser bastante prático e sensível, podendo ser utilizado em laboratório como rotina, na análise de um grande número de genes (BUBNER & BALDWIN, 2004).

Embora a técnica de qPCR possa contribuir na determinação do número de cópias do transgene, essa técnica deve ser utilizada com cautela, pois, este método, determina a quantidade do transgene em relação a um calibrador endógeno, e não o exato número de cópias, e por isso, uma correta interpretação dos dados deve ser realizada. Outro dado importante na interpretação dos resultados do qPCR é o desvio padrão, pois os Ct's das triplicatas realizadas nos experimentos podem variar muito, o que induziria a resultados não precisos, chegando a até uma cópia de diferença. Bubner e Baldwin, (2004) estabeleceram esse valor em não mais que 0,3 para as triplicatas, no entanto, cabe ressaltar que, a qualidade do DNA extraído em extrações massivas, também pode interferir no desvio padrão final. Logo, a acurácia de Ct's com desvios acima de 0,3 vai diminuindo (BUBNER & BALDWIN, 2004). O valores do Ct's, também influenciam no desvio, por isso realiza-se a padronização da concentração dos iniciadores e da quantidade do DNA, sendo ideal que os Ct's não ultrapassem 25.

Considerando os dados acima, a técnica de qPCR deve ser vista como um complemento, e não substituição a outros métodos como o *Southern Blot* (BUBNER & BALDWIN, 2004).

2.8.3. Método comparativo Δ Ct para quantificação do número de cópias, e expressão relativa gene de interesse

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

Para a quantificação relativa empregando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, inicialmente é realizada a validação do experimento, para que as eficiências de amplificação do gene alvo e da referência interna sejam próximas (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Com isso, utilizando esta fórmula, pode-se inferir a quantidade do gene alvo, normalizada para uma referência endógena e em relação ao calibrador. O calibrador pode ser uma amostra alvo previamente caracterizado com uma cópia do gene homozigota (ou duas cópias alélicas), ou o próprio gene endógeno usado para normalização, descartando assim o uso de um calibrador conhecido. Desta última forma, o número de cópias do gene alvo é determinado em relação ao gene endógeno que funciona como próprio calibrador nas amostras, (ROLLA, 2009). Logo, não se usa o $\Delta\Delta Ct$, mas sim o ΔCt , uma derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

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

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construções utilizadas no processo de transformação

Dois diferentes vetores foram co-transformados em soja. O cassete de expressão *pBI22135SAtAREB1ΔQT* (CLONTECH) contendo o gene alvo *AREB1ΔQT*, sob o controle do promotor constitutivo 35S *CaMV* (*Cauliflower Mosaic Virus* – Vírus do Mosaico da couve-flor) e o terminador *NOS* (*Nopaline Synthase* – *Agrobacterium tumefaciens*) possui um tamanho de 4.486 pares de bases e foi cedido pelo *JIRCAS* (*Japan International Research Center for Agriculture Science*) à Embrapa Soja, através de acordo Mútuo de Transferência de Material (MTA) (Figura 9A). O outro cassete de expressão utilizado foi, o *pAC321* (EMBRAPA CENARGEN/BASF) que contém o gene marcador de seleção *Ahas*, que confere resistência ao agente de seleção, o herbicida imazapir. Esse plasmídeo possui um tamanho de 8.673 pares de base (Figura 9B).

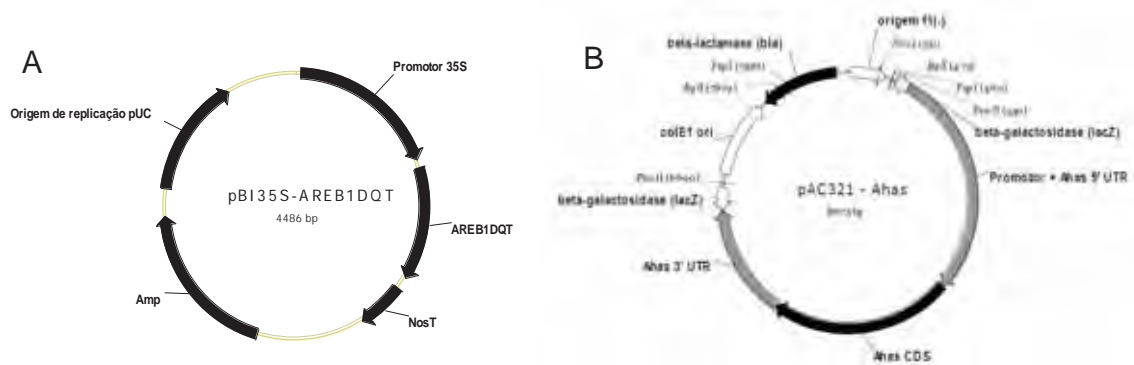


Figura 9. Em A: Plasmídio pBI221 com o inserto (35S promotor + AREB1ΔQT + NOS terminador): tamanho de 4.486 pb. Em B: Plasmídio pAC321 contendo a sequência do gene *Ahas* (promotor/ *Ahas* 5'UTR (região não transcrita 5') + *Ahas* sequência codificadora + terminador/*Ahas* 3'UTR (região não transcrita 3')). Tamanho de 8.673pb.

3.2. Obtenção das plantas de soja transformadas com a construção *35S:AtAREB1ΔQT*

Embriões imaturos da cultivar de soja convencional BR16, considerada sensível ao estresse hídrico, foram co-transformados pelo processo de biobalística, segundo o protocolo proposto por RECH et al., (2008). Inicialmente, foi realizada a assepsia das sementes, com etanol 70% durante 10 min, seguido de imersão por 20 min em solução de hipoclorito de sódio, a 50%, e posterior lavagens com água destilada. Por fim, as sementes foram imersas em água para hidratação, por aproximadamente 16 h. Com o auxílio de pinças e bisturis estéreis, os embriões de soja foram retirados e depositados em placas de petri com água destilada, para evitar a dessecação. Os primórdios foliares, foram retirados com o auxílio de um microscópio estereoscópio modelo SQZ-DS4-BI *Tecnival*, e colocados em papel filtro para secagem em fluxo laminar.

O DNA exógeno utilizado no bombardeamento consistiu em 3 µl, (equivalente a 8 µg/mL) do gene de interesse *35S:AtAREB1ΔQT*, e 3 µl (8 µg/mL) do gene de seleção *ahas*. O DNA foi precipitado em 50 µl da suspensão de micropartículas de tungstênio, com 40 µl de espermidina a 0,1 M, e 110 µl CaCl₂ a 2.5 M. Em seguida, a mistura foi sonicada por aproximadamente 2 seg, e alíquotas de 3,2 µl foram distribuídas em membranas carregadas de Kapton, posicionadas no suporte de membrana. As partículas foram então aceleradas em alta velocidade, atingindo o meristema apical dos embriões de soja. Após a co-transformação, os embriões foram transferidos para meio de cultura MS (*Murashige and Skoog*) suplementado com benzilaminopurina (BAP 5 mg/mL), 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH 5,7, por um período de 16 h – 20 h, ao abrigo da luz, a 28°C, para a indução do multibrotamento. A seguir, grupos de aproximadamente oito embriões, foram transferidos para copos plástico contendo meio seletivo (MS, 3% sacarose, 0,2 µM imazapir, 0,8% ágar, vitaminas B5, pH 5,7), permanecendo por aproximadamente 45 dias em câmara climatizada, com 16 h de fotoperíodo, e luminosidade de 50 µ mols m⁻²s⁻¹, a 25°C e a 60% de umidade. Transcorrido este período, os embriões foram transferidos para copos plásticos contendo areia:vermiculita (1:1), regados com solução nutritiva e cobertos com sacos plásticos para aclimatação. Após identificação dos eventos positivos, estes foram transferidos para casa de vegetação.

3.3. Análise de plantas transformadas de soja

Para identificar plantas positivas para as construções inseridas, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada. DNA genômico de soja foi extraído de folhas jovens, utilizando o protocolo de DOYLE & DOYLE, (1987). Os fragmentos foram amplificados utilizando três conjuntos específicos de pares de iniciadores, que flanqueiam diferentes regiões do gene alvo. O conjunto de iniciadores Areb1-6 amplifica do início região promotora até o início da região codante, resultando em um fragmento de 904 pb, enquanto que, o conjunto de iniciadores Areb1-7 amplifica do meio do promotor até o final da região codante, resultando em um fragmento de 639 pb. Finalmente o par de iniciadores Areb1-8, flanqueia do final do promotor até o início da região terminadora e amplifica um fragmento de 866 pb. Um conjunto de iniciadores específicos para o gene marcador de seleção *ahas*, também foi utilizado, gerando um fragmento amplificado de 1.502 pb (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados na amplificação por PCR para confirmação dos eventos positivos

Gene	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>	Fragmentos
<i>Ahas</i>	5' ACTAGAGATTCCAGCGTCAC 3'	5' GTGGCTATACAGATACCTGG 3'	1502pb
Areb1 iniciador 6	5' AGGTCTCATCAAGACGATCTAC 3'	5' AACGAGTATATCGAACCTTGTC 3'	904pb
Areb1 iniciador 7	5'AGAAGAAAATCTTCGTCAACAT 3'	5' TAACAACATCCATGTTTCATT 3'	639pb
Areb1 iniciador 8	5' GAAGTTCATTTCAATTTGGAGAG 3'	5' ACATGCTTAACGTAATTCACCA 3'	866pb

A reação de PCR foi composta de 1 µl a 5 µM de cada iniciador, 1 µl a 2,5 mM de dNTP's (Invitrogen), 1 µl 50 mM cloreto de magnésio (Sigma), 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,2 µl a 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 3 µl a 60 ng de DNA, em um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystem, Foster, CA, USA*), e o programa de ciclagem utilizado foi composto por desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e, por fim, um ciclo a 72°C por 7 min.

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, e visualizados em transluminador UV (*Loccus Biotecnologia modelo LPIX*). Os eventos inicialmente identificados como positivos para a construção gênica *35S:AREB1ΔQT*, foram testados para identificação de quimeras.

3.4. Identificação de plantas quiméricas

O fenômeno de formação de quimeras, plantas compostas por tecido transformado e não transformado, é frequentemente observado após a regeneração de plantas transgênicas. Como princípio, uma planta transgênica deve ser estável em todas as etapas de seu desenvolvimento, por isso é muito importante que as quimeras sejam identificadas e descartadas durante o processo de regeneração.

Para identificar possíveis plantas quiméricas, três amostras de folhas, de três diferentes partes de uma mesma plântula transformada foram coletadas e o DNA genômico foi extraído, segundo o protocolo proposto por DOYLE & DOYLE, (1987). Reações de PCR utilizando os três diferentes conjuntos de pares de iniciadores, foram realizadas para a identificação de eventos transgênicos não quiméricos. Foi considerado evento não quimérico aquele em que todas as amostras de folhas testadas confirmaram a presença do transgene, caso contrário, se pelo menos uma das amostras de folha não apresentasse a inserção, o evento era considerado quimérico.

Somente após a confirmação do teste de quimera, as plantas identificadas como positivas, foram transferidas para a casa de vegetação para avanço de geração e multiplicação de sementes a serem utilizadas nas análises posteriores.

3.5. Segregação dos eventos na geração T₁

Para a análise de segregação dos eventos GMs gerados, sementes provenientes de plantas da geração T₀ foram semeadas em vasos com terra, e após o crescimento, amostras de folhas foram coletadas para extração de DNA genômico, seguido por análise de PCR convencional para confirmação da presença do inserto do gene de interesse. O cálculo da segregação foi realizado pelo teste do qui-quadrado.

3.6. *Southern blot* para análise do número de insertos do gene alvo

3.6.1. Extração de DNA genômico

Para análise via *Southern blot*, DNA genômico de amostras de plantas GMs, da geração T₀ e T₁ foi extraído, de acordo com o protocolo de extração de DNA CTAB proposto por MURRAY & THOMPSON, (1980). Foi utilizado cerca de 1 µg de material foliar macerado em nitrogênio líquido, adicionados a 1 mL de tampão de extração (2 g CTAB, 10 mL de TRIS-HCl 1 M, 4 mL de EDTA 0,5 M, 8,2 g de NaCl, 200 µL de β-mercaptoetanol). O material foi incubado a 65°C por 60 min, e agitado a cada 15 min. A seguir foram adicionados 1 mL de clorofórmio e a solução agitada por 5 min. Posteriormente, o material foi centrifugado por 10 min a 5220 g, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e 600 µL de isopropanol foram adicionados. A solução foi homogenizada por 1 min, e centrifugada a 8160 g, por 15 min. Em seguida, o *pellet* foi tratado com 400 µL de tampão TE e RNase (99,2% TE e 0,8% de RNase) e incubado a 37°C por 30 min. Foram adicionados na amostra 400 µL de clorofórmio e a solução foi agitada por 5 min e centrifugada a 16000 g, por 10 min. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado por 30 min a temperatura ambiente, utilizando-se 40 µL de acetato de sódio a 3 M e 1 mL de etanol 100%. As amostras foram então centrifugadas a 16000 g por 15min, o álcool descartado e adicionados 200 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 16000 g por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado, e o *pellet* seco por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura.

Para verificar a qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese com tampão SB (hidróxido de sódio e ácido bórico) 1X, em gel de agarose 1,0% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizadas sob luz UV em aparelho transluminador. A quantificação do DNA foi feita em *Nanodrop 1000*.

3.6.2. Digestão das amostras e preparo da sonda

Um total de 10 µg de DNA de cada amostra foi digerido com a enzima *HindIII* (50U/µl) (Invitrogen), que realiza corte único, na região promotora do plasmídeo

contendo o gene de interesse. As reações foram incubadas a 37°C em termociclador durante a noite, e os fragmentos digeridos separados em gel de agarose a 0,8%, por um período de 4 h. Após eletroforese, o gel foi incubado por 10 min em solução de depurinação (17 ml de HCl a 0,2 M, (pH 7.0) e 983 ml de água destilada), em seguida, transferido para a solução de desnaturação (20 g NaOH a 0,5 M e 87,7 g de NaCl a 1,5 M e água para completar o volume de 1 L), por 30 min, e finalmente o mesmo processo foi realizado para a solução de neutralização (121,1 g de Tris Base a 1 M, 175,4 g de NaCl a 3 M e água para completar o volume de 1 L). Após as lavagens, o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de náilon (*Hybond*TM -N⁺, GE Healthcare, Amersham) em SSC 20X (175,3 g de NaCl a 3 M, e 88,2 g de Citrato de sódio a 0,3 M e água para completar o volume de 1 L), por 18 h. O DNA foi então fixado na membrana por 5 min em transluminador, e em seguida, a membrana foi lavada em SSC 2X por 5 min, seca em estufa, à 80°C e pré-hibridizada com a solução de hibridização *ULTRAhyb*TM (*Ambion*) a 42°C, por 2 h.

Para a síntese da sonda, foram utilizados um conjunto de pares de iniciadores (*forward* 5' TGATGAGTTTCAGAGCAGTG 3' e *reverse* 3' TCTCCTGATTCTTTTGC ATT 5') que amplificam um fragmento de 1.083 pb, correspondente a uma parte específica da região codante do gene alvo *35S:AREB1ΔQT*. O produto da PCR foi purificado usando o *kit Promega Wizard SV Gel e PCR Clean-up System* e a marcação da sonda foi feita utilizando o *kit DECAprime*TM II Kit (*Ambion*) com aproximadamente 30 ng de produto de PCR e o radioisótopo ³²P. A sonda foi desnaturada por 5 min a 100°C, imediatamente transferida e mantida em gelo por 5 min. A sonda foi centrifugada brevemente e em seguida adicionada ao cilindro contendo a membrana pré-hibridizada. A reação de hibridização foi conduzida a 42°C, por no mínimo 18 h, em solução de hibridização *UltraHyb* (*Ambion*). Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes por 30 min em cada uma das seguintes soluções: 2xSSC, 0,1%SDS, seguido por 1xSSC, 0,1%SDS, e finalmente 0,1xSSC, 0,1%SDS, a 42°C. Após este processo, as membranas foram colocadas para exposição em filme fotográfico *Kodak BioMax*.

3.7. Quantificação do número de cópias do transgene via qPCR pelo método $2^{-\Delta Ct}$

As sequências dos iniciadores e da sonda para a metodologia *TaqMan*, foram desenhadas excluindo-se as regiões em comum onde uma possível amplificação do gene AREB1 endógeno pudesse ocorrer (Tabela 2). Para isto, foram utilizados os programas *Vector NTI 11*, *MEGA 4*, *ClustalX 2.1* e *CLC Sequence viewer*.

Para que não ocorresse nenhuma amplificação de genes ortólogos de *AtAREB1*, foi feito um alinhamento *pairwise* no banco de dados da soja (*Phytozome*). Depois de identificado os genes mais similares (*Glyma02g14880*, *Glyma07g33600*, *Glyma13g22060* e *Glyma10g08370*) e também os GmbZIPs (previamente descritos como 1, 44, 62, 78 e 132), um alinhamento múltiplo foi realizado para ancorar a sequência do transgene com as sequências das possíveis regiões ortólogas.

Tabela 2. Sequências de iniciadores e sondas da análise do número de cópias do gene alvo por qPCR

Alvo/ endógeno	Sequências	Fragmento amplificado
35S:Areb1-Forward	GGAGGTGGAGGGTTGACTAGA	67pb
35S:Areb1-Reverse	CACTGCTCTGAAACTCATCAAACG	
35S:Areb1-Sonda	TCAACGAGTATATCGAACCTT	
GmLectina-1664 Forward	TCC CGA GTG GGT GAG GAT AG	65pb
GmLectina-1728 Reverse	CAT GCG ATT CCC CAG GTA TG	
GmLectina-1688 Sonda	TCT CTG CTG CCA CGG GAC TCG	

Para a análise do número de cópias inseridas, o gene endógeno lectina (*GmLec*, Acesso No. K00821), espécie-específico da soja e com apenas uma cópia no genoma haplóide, ou duas cópias alélicas (homozigoto), foi utilizado como gene calibrador.

Para ambos os genes, alvo e calibrador (*AtAREB1* e *GmLec*), uma curva de eficiência de amplificação foi realizada, utilizando-se uma série de diluições do DNA (10 a 10^{-4}). Para verificar a melhor eficiência de amplificação dos iniciadores na reação, a placa do experimento foi montada em triplicata para ambos os genes. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram 50°C por 2 min, 95°C por 2 min seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. As reações de PCR foram realizadas em termociclador 7300 *Real Time System* (*Applied Biosystem*, Foster, CA, USA).

Uma derivação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizada na determinação do número de cópias do transgene nas plantas GMs, das gerações T_0 e T_1 , (LIVAK & SCHMITTGEN,

2001; ROLLA 2009). Na fórmula derivada $2^{-\Delta Ct}$, os valores de Ct do alvo *AtAREB1* foram subtraídos do Ct da referência endógena lectina (usada como calibradora) em cada amostra, resultando no valor de ΔCt . O cálculo final para o número de cópias é 2 elevado a média de $-\Delta Ct$ ($2^{-\Delta Ct}$), onde o número 2 corresponde à somatória das eficiências do gene alvo (100% = 1) e do controle endógeno (100% = 1) que normalmente são valores próximo de 1. O cálculo do número de cópias se encontra em anexo.

3.8. Análise da expressão gênica relativa do transgene via RT-qPCR

A análise da expressão gênica relativa de *AtAREB1* nas plantas GMs da geração T₁, foi detectada em condições controle (sem tratamento), uma vez que, o gene alvo estava sob o controle de um promotor constitutivo. Amostras de folhas de plantas de soja foram coletadas, maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o protocolo com Trizol (*Invitrogen Life Technologies*), conforme as instruções do fabricante. A seguir, as amostras foram tratadas com o *kit DNase I Amplification Grade*, (*Invitrogen Life Technologies*), para a eliminação de qualquer DNA remanescente nas amostras e então, uma reação de PCR utilizando iniciadores que amplificam íntrons do gene β -actina foi realizada. O resultado foi verificado em gel de agarose, onde foi possível observar uma diferença de tamanho de 80 pb entre as bandas amplificadas do DNA genômico da cultivar convencional BR16 (controle positivo) e do RNA da amostra, isto ocorre, pois, o RNA não possui íntrons, logo possui uma banda menor que a do DNA. Cerca de 1 μ g dos RNAs total foram utilizados para a síntese do cDNA utilizado o *kit Superscript[®] III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen Life Technologies*).

A quantificação relativa do nível de expressão gênica, para cada gene e tratamento analisado, foi realizada utilizando-se as amostras em triplicatas biológicas. As reações foram conduzidas em termociclador ABI PRISM[®] 7500 *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) utilizando o *kit SYBR[®] Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), conforme as instruções do fabricante. Como normalizador foi utilizado o

gene de β -actina que apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos sob condições de estresse hídrico (acesso nº: GMU60500), validado por (STOLF-MOREIRA et al., 2011) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados na análise da expressão do transgene

Alvo/ endógeno	Sequências	Fragmento amplificado
RT-35S-Areb1_F	GGAGGTGGAGGGTTGACTAGA	155pb
RT-35S-Areb1_R	CACTGCTCTGAAACTCATCAAACG	
GmBeta-Actina -F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	118pb
GmBeta-Actina -R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	

A eficiência da reação de amplificação para o gene alvo e gene normalizador β -actina foi estimada através de uma série de diluições do cDNA (10 a 10^{-4}). A reação de quantificação relativa foi realizada em um volume final de 12,5 μ L, adicionando-se 6,25 μ L de *SYBR Green PCR Master Mix 2X* (enzimas uracil DNA-N-glicosilase e *AmpliTaq Gold*, $MgCl_2$, dNTPs, KCl e o fluoróforo *SYBR green*); 0,2 μ M de cada iniciador *Forward* e *Reverse*; 1 μ L de cDNA na concentração 10^{-1} , 1 μ L fluoróforo ROX na concentração 1:10 e água milliQ[®] para completar o volume final. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 2 min, 60°C por 1 min, sendo coletados os dados nesta última etapa.

A determinação dos níveis de expressão do gene alvo foi realizada pela quantificação relativa utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para cada tratamento foi detectado o valor de Ct para ambos dos genes alvo e normalizador (β -actina). O valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação, obtendo-se o valor de ΔCt . Em seguida, o valor ΔCt dos tratamentos foi subtraído do valor do ΔCt da amostra calibradora (amostra controle), resultando no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi ainda utilizado na fórmula do nível de expressão, $x^{(-\Delta\Delta Ct)}$ onde x representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Neste estudo, a planta GM identificada como A2639-34 foi utilizada como calibrador. Para as análises estatísticas foi aplicado o teste T com um valor para nível de significância igual a 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de plantas positivas estáveis e quiméricas para o transgene *35SA_tAREB1 Δ QT*

Um total de 2.045 embriões da cultivar de soja BR16 foram co-transformados com a construção *35SA_tAREB1 Δ QT*; 1.437 plantas foram analisadas via PCR convencional, utilizando-se os três conjuntos de iniciadores específicos e 21 plantas foram identificadas como positivas para gene o *AREB1 Δ QT* na geração T₀. Destas, 05 morreram e 16 foram submetidas ao teste de quimera (170, 193, 673, 822, 895, 1793, 2619, 2639, 2651, 2654, 2658, 2710, 2769, 2770, 2772 e 3472), e 12 foram consideradas estáveis (não quiméricas) para a construção inserida, ou seja, eventos que confirmaram a presença do transgene, em todas as três amostras de folhas coletadas de diferentes partes da planta (Figura 10).

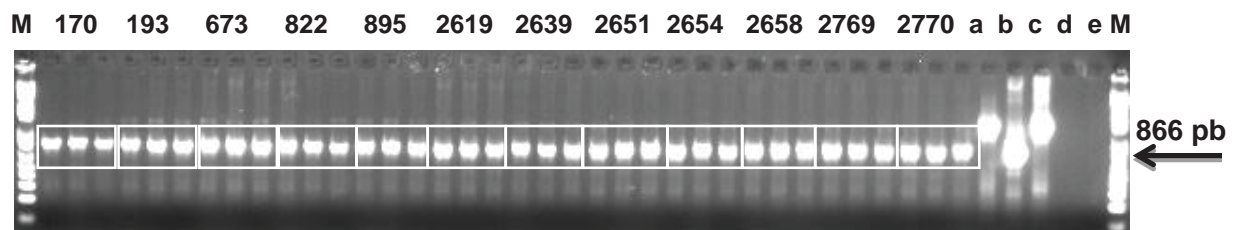


Figura 10. Plantas positivas com o gene alvo *AtAREB1 Δ QT*, confirmadas como não quiméricas. M: Marcador molecular 1kb plus. 12 eventos positivos, 170, 193, 673, 822, 895, 2619, 2639, 2651, 2654, 2658, 2769, 2770. a: corresponde respectivamente ao controle positivo *AREB1* da construção inteira, b: controle positivo da construção deletada *AtAREB1 Δ QT*, c: controle positivo com uma terceira construção de *AREB1*, d: controle negativo BR16, e: branco. Nesta figura os fragmentos foram amplificados utilizando o conjunto de iniciador 8 que amplifica um fragmento de 866 pb.

Os 4 eventos considerados quiméricos, ou seja, plantas GMs que não confirmaram a presença do transgene em todas as amostras de folhas testadas, foram: 1793, 2710, 2772, 3472. Estes eventos foram descartados das análises posteriores (Figura 11).

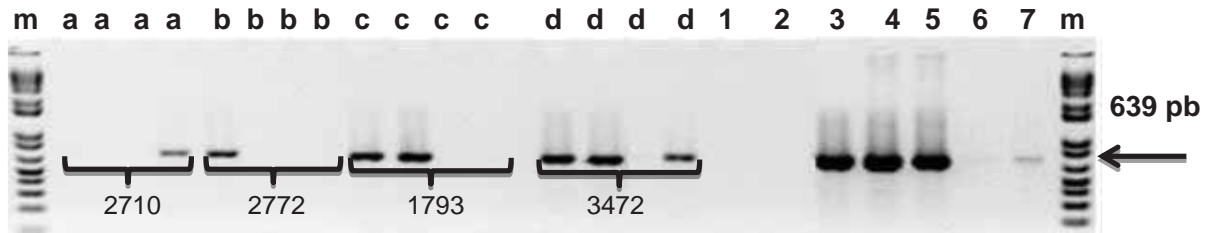


Figura 11. Quatro plantas classificadas como quimeras para a construção 35S:*AtAREB1* Δ QT. M: marcador molecular 1kb plus. a: corresponde a 4 repetições de diferentes partes avaliadas da planta 2710. b: corresponde a 4 repetições de diferentes partes avaliadas da planta 2772. c: corresponde a 4 repetições de diferentes partes avaliadas da planta 1793. d: corresponde a 4 repetições de diferentes partes avaliadas da planta 3472. 1: branco, 2: branco, 3: controle positivo *AREB1* da construção inteira, 4: controle positivo da construção deletada *AtAREB1* Δ QT, 5: controle positivo com uma terceira construção de *AREB1*, 6: controle negativo BR16 e 7: controle negativo branco. O conjunto de iniciador utilizado foi o 6, que amplifica um fragmento de 639 pb.

As 12 plantas positivas para a construção inserida e identificadas como estáveis, foram transferidas para casa de vegetação para aclimatação e avanço de geração (Figura 12).



Figura 12. Plantas T₀ identificadas como estáveis para o gene *AtAREB1* Δ QT crescendo em casa de vegetação para avanço de geração.

A eficiência de transformação foi calculada de acordo com RECH et al. (2008), onde a mesma é dada pelo número total de plantas transgênicas férteis obtidas, dividido pelo número total de explantes transformados. Neste estudo, uma eficiência de transformação de 0,59% (12 eventos positivos estáveis/2045 embriões transformados) foi obtida.

Quando a presença do gene de seleção *ahas* foi analisada, em nenhuma das 12 plantas GMs a presença do inserto foi confirmada, ou seja, a eficiência de transformação para esse gene foi de 0% nestas plantas (Figura 13).

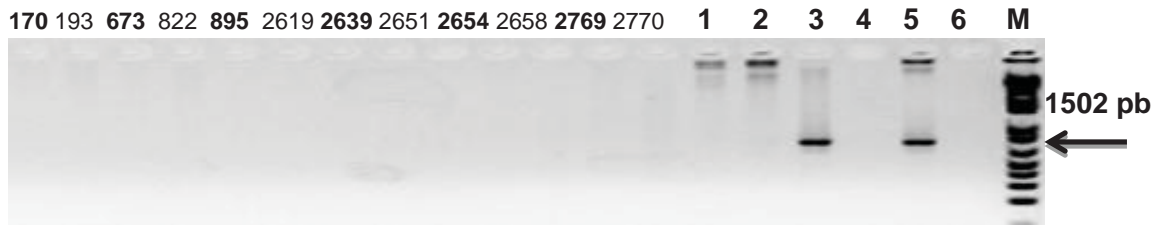


Figura 13. 12 Plantas identificadas como negativas para o gene de seleção *ahas*: 170, 193, 673, 822, 895, 2619, 2639, 2651, 2654, 2658, 2769, 2770. 1: controle positivo *AREB1* da construção inteira, 2: controle positivo da construção deletada *AtAREB1ΔQT*, 3: controle positivo do plasmídeo *PAC321*, 4: branco, 5: controle positivo do plasmídeo *PAC321* e 6: branco. O par de iniciadores utilizado nesta reação amplifica um fragmento de 1502 pb.

4.2. Segregação dos eventos na geração T₁

Dos 12 eventos positivos obtidos em T₀, somente 3 passaram o gene *AREB1ΔQT* para a geração seguinte, sendo estes os eventos: 2639, 2651 e 2654. Alguns mecanismos genéticos podem explicar a não transmissão do transgene a sua descendência T₁ nos demais 9 eventos GMs restantes (170, 193, 673, 822, 895, 2619, 2658, 2769, 2770), e serão melhor discutidos no decorrer deste trabalho.

Um total de 28 plantas provenientes dos três eventos T₀, (2639, 2651 e 2654) tiveram a presença do transgene confirmada via PCR convencional: 9 plantas do evento 2639, 14 plantas do evento 2651 (Figura 14) e 5 plantas do evento 2654.

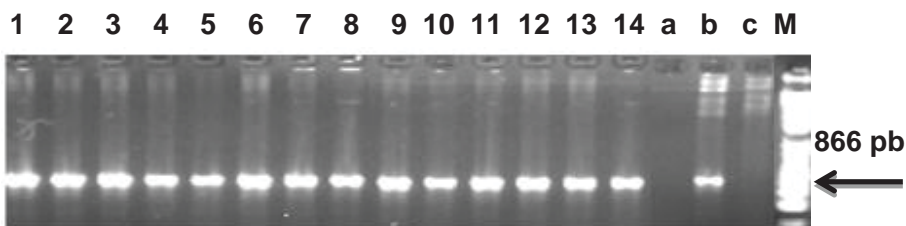


Figura 14. PCR das 14 plantas positivas T₁ provenientes do evento 2651. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, e 14 correspondem respectivamente às plantas 2651-1, 2651-2, 2651-4, 2651-7, 2651-16, 2651-17, 2651-18, 2651-19, 2651-27, 2651-28, 2651-31, 2651-32, 2651-33, 2651-35. a: controle negativo branco, b: controle positivo da construção deletada *AtAREB1ΔQT*, controle negativo BR16. O conjunto de iniciador utilizado foi o 8, que amplifica um fragmento de 866 pb.

Das três linhagens identificadas em T₁, nenhuma apresentou o padrão de segregação Mendeliana 3:1 esperada, sendo a segregação apresentada pelos eventos bastante complexa: 1:6 para linhagem 2639, 2:3 para a linhagem 2651 e 1:3 para a linhagem 2654 (Tabela 4).

Tabela 4. Segregação dos eventos GM na geração T₁

Eventos T ₀	Eventos T ₁	Positivas F ₀	Negativas	Total negativas /4	Fe	Segregação	χ^2	P(%)
170	7	0	7	1,75	5,25	-	5,25	NS
193	20	0	20	5	15	-	15	NS
673	18	0	18	4,5	13,5	-	13,5	NS
822	41	0	41	10,25	30,75	-	30,75	NS
895	9	0	9	2,25	6,75	-	6,75	NS
2619	14	0	14	3,5	10,5	-	10,5	NS
2658	20	0	20	5	15	-	15	NS
2770	2	0	2	0,5	1,5	-	1,5	NS
2639	62	9	53	15,5	46,5	1 X 6	30,24	S
2651	35	14	21	8,75	26,25	2 X 3	5,71	S
2654	20	5	15	5	15	1 X 3	6,66	S
2769	2	0	2	0,5	1,5	-	1,5	NS

S: significativo, NS: não significativo, F₀: frequência observada, Fe: frequência esperada.

A planta T₁ 2654-14, do evento 2654, quando em casa de vegetação, apresentou atraso no crescimento quando comparada com as plantas T₁ negativas do mesmo evento e também com as plantas dos outros dois eventos T₁ obtidos, 2639 e 2651. Esse fenótipo pode estar relacionado, ao alto número de cópias inseridas identificadas neste evento, que será melhor discutido no decorrer deste trabalho (Figura 15).



Figura 15. Alteração fenotípica da planta T₁ 2654-14 proveniente do evento T₀ 2654. Esta planta em casa de vegetação apresentou retardo no crescimento.

A planta T₁ 2651-31, do evento 2651, quando em casa de vegetação, apresentou vagens com muitos pêlos, e sementes verdes causando atraso na maturação (Figura 15). Estas alterações podem estar relacionadas ao local de integração do transgene, e também da possível ocorrência de rearranjos nesta planta. (Verificar intensidade da banda no *Southern blot* para esta planta, Figura 16).



Figura 16. Alteração fenotípica da planta T₁ 2651-31 proveniente do evento T₀ 2651. Em A: fenótipo da planta T₁ mostrando folhas enrugadas, em B: vagens com muitos pêlos e em C: sementes verdes, com atraso na maturação.

4.3. Análise do número de insertos do gene alvo via *Southern blot* e número de cópias via qPCR.

A técnica de *Southern blot* foi utilizada, para estimar o número de inserções do transgene, e não o número de cópias, uma vez que, o DNA genômico foi digerido com uma única enzima de restrição que corta especificamente na região promotora do gene *AREB1ΔQT*. Para que o número de cópias fosse avaliado, era necessário o uso de mais de uma enzima de restrição que cortasse especificamente todo ou boa parte do fragmento contendo gene de interesse dentro do genoma receptor.

Um total de 10 plantas T_0 e 28 plantas T_1 provenientes dos eventos 2639, 2651, 2654 foram analisadas por esta metodologia. Nas plantas T_0 , o número de inserções variou de 2-5: 2769 [(5 inserções), 2658 (4 inserções), 2654 (4 inserções), 2651 (2 inserções), 2639 (4 inserções), 2619 (4 inserções), 895 (2 inserções), 822 (?), 673 (2 inserções), 193 (3 inserções)], enquanto que nas plantas T_1 as inserções também variaram de 2-5 inserções: 2639- 22 (4 inserções), 2639-15 (4 inserções), 2639-11 (5 inserções), 2639-1(5 inserções), 2654-16 (4 inserções), 2654-14 (4 inserções), 2654-12 (4 inserções), 2654-3 (4 inserções), 2651-35 (2 inserções), 2651-33 (2 inserções), 2651-31 (3 inserções), 2651-28 (2 inserções), 2651-27 (2 inserções), 2651-19 (2 inserções), 2651-7(2 inserções), 2651-4 (4 inserções) e 2651-2 (3 inserções). (Figura 17 e 18). As plantas identificadas com o ponto de ?, não puderam, ser avaliadas quanto ao número de inserções.



Figura 17. Plantas da geração T_0 analisadas pela técnica de *Southern blot*. Eventos: 2769, 2658, 2654, 2651, 2639, 2619, 895, 822, 673 e 193 e controle negativo BR16.

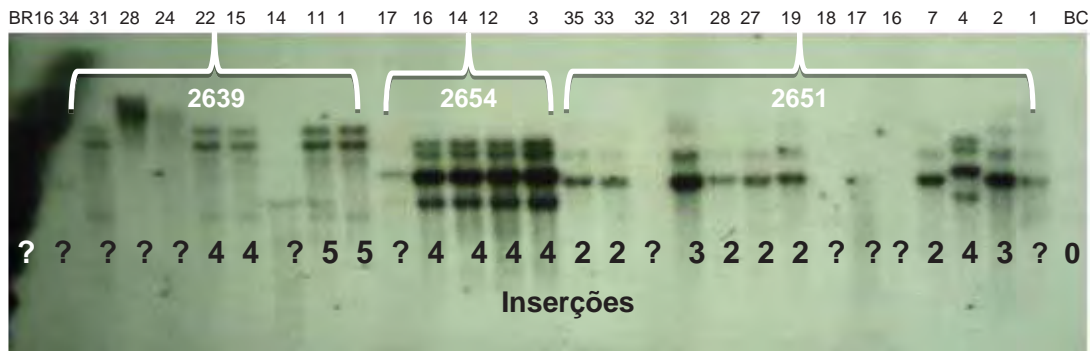


Figura 18. 28 Plantas da geração T₁ analisadas pela técnica de *Southern blot*. A identificação dos eventos estão na seguinte ordem (da esquerda para direita): Controle negativo BR16 (?), 9 plantas T₁ do evento T₀ 2639: 2639-34 (?), 2639-31 (?), 2639-28(?), 2639-24 (?), 2639-22, 2639-15, 2639-14 (?), 2639-11, 2639-1, 5 plantas T₁ do evento T₀ 2654: 2654-17 (?), 2654-16, 2654-14, 2654-12, 2654-3, 14 plantas T₁ do evento T₀ 2651: 2651-35, 2651-33, 2651-32 (?), 2651-31, 2651-28, 2651-27, 2651-19, 2651-18 (?), 2651-17 (?), 2651-16 (?), 2651-7, 2651-4, 2651-2, 2651-1 (?) e BC é o branco, com 0.

O resultado indicou que o gene *35S:AtAREB1ΔQT* foi integrado nas plantas T₀ e que sofreu rearranjos nas plantas T₁, gerando eventos independentes. A diferença no número de inserções ocorre, pois plantas T₁ depois de autofecundadas sofrem recombinações ou até mesmo duplicações do transgene. Para algumas plantas T₁ não foi possível estimar o número de inserções, seja por artefato da técnica ou material biológico insuficiente.

Quando o número de cópias (quantidade do transgene) foi avaliado pelo método de qPCR, uma curva para determinação da eficiência dos conjuntos de iniciadores foi realizada e os resultados indicaram os valores de eficiência de 98% para o transgene *AtAREB1* e 95% para o gene *GmLec* (Figura 19).

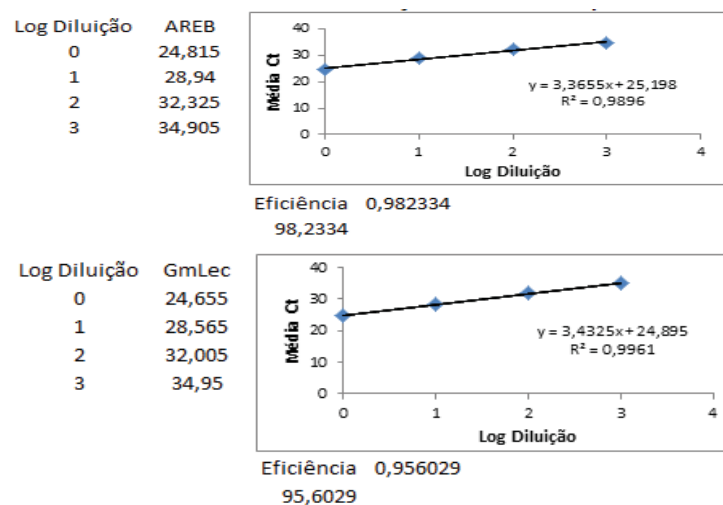


Figura 19. Determinação da eficiência do sistema multiplex *TaqMan* para os alvos *AtAREB1* e endógeno *GmLectina*. Uma amostra GM foi diluída serialmente 4X e as diferentes diluições foram amplificadas em sistema multiplex para os alvos e o endógeno. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e eixo x log da diluição. a) Estimativa da eficiência do gene *AtAREB1* com *slope* = 3,3655. b) Estimativa da eficiência do gene *GmLec* de referência endógena com *slope* = 3,4325.

Das 10 plantas T_0 avaliadas pelo método qPCR, 07 eventos, 193, 673, 822, 895, 2619, 2658, 2769 não transmitiram o transgene para a primeira geração. Dentre estes, destaque-se em T_0 os eventos 822, 2769 que apresentaram uma alta quantidade do transgene (16) e (8) respectivamente, que foi correlacionado com o alto número de inserções (7) e (5). Apesar do alto número de cópias identificado nestes eventos, para o evento 822 que apresentou 8 cópias do transgene, o seu desenvolvimento não foi tão comprometido, pois, este gerou 41 sementes T_1 , entretanto, todas foram negativas. Já o evento 2769, que apresentou 4-5 cópias do transgene, o seu desenvolvimento foi bastante afetado, produzindo apenas duas sementes T_1 . Lembrando que uma planta não transgênica produz em torno de 70-80 sementes.

Nos eventos 193, 673, 895, 2619 e 2658 o número de inserções (3, 2, 2, 4 e 4), foi menor que o número de cópias, sendo que, nestas plantas foram inseridas respectivamente 1, 1, 1, 1-2, e 2 cópias. Esta análise deve ser repetida, pois o número de cópias nunca deve ser menor que o número de inserções. Para os eventos 193, 673 e 895 a resolução do gel dificultou a contagem do número de inserções, e por isso deve ser repetido, pois, somente uma estimativa do número de inserções foi feita. Para eventos 2619 e 2658, bandas com diferentes intensidades foram observadas, o que indica que estas plantas possuem uma maior quantidade de transgene do que foi quantificado, necessitando também de uma nova análise.

Como os eventos são gerados independentemente e a quantidade e o local de inserção no genoma ocorrem ao acaso, especula-se que o número de cópias não está exclusivamente relacionado à produção de sementes de uma planta, pois, a planta 822 que apresentou 8 cópias não teve seu desenvolvimento tão afetado, gerando 41 sementes, em contraste, a planta 2769 que apresentou 4-5 cópias foi afetada e produziu somente duas sementes. Nos demais eventos com menor número de cópias a produção também foi afetada, o evento 673 gerou 18 sementes, o evento 895 produziu 9 sementes, o evento 2658 gerou 20 sementes, o evento 193, 20 sementes e

finalmente o evento 2619 produziu 14 sementes. A baixa produção de sementes neste caso pode estar relacionada ao gasto de energia, ocasionado pelo promotor constitutivo 35S, no qual está ligado o gene de interesse deste trabalho.

Na Tabela 05 está apresentado o número de inserções, quantidade de transgene, número de cópias, e a produção de sementes dos 07 GMs da geração T₀ que não transmitiram o transgene para a primeira geração.

Tabela 5. Número de inserções, quantidade do transgene e produção nas plantas T₀ que não segregaram

	Número de inserções por <i>Southern blot</i>	Quantidade do transgene/ número de cópias por qPCR	Número de cópias	Produção de sementes T ₂
193 ^a	3	2	1	2
673 ^a	2	2	1	2
822 ^b	7	16	8	41
895 ^a	2	2	1	2
2619 ^a	4	3	1-2	3
2658 ^a	4	4	2	4
2769 ^b	5	8	4-5	2

a) Plantas com número de inserções maior do que o número de cópias (repetir a análise), b) plantas com alto número de cópias compatível com o número de inserções.

As análises feitas nos eventos 2639, 2651 e 2654 que transmitiram o transgene para a primeira geração, mostraram que:

Para o evento T₀ A2639, a técnica de qPCR detectou 5 quantidade de transgene, ou seja, esta planta possui dois e meio mais quantidade de transgene que o calibrador endógeno lectina, considerando que a comparação é feita com duas cópias alélicas da referência endógena. Isso significa que, esta planta pode ter de duas ou três cópias por genoma haploíde (n). No entanto, considerando o método de *Southern blot*, onde o evento T₀ A2639 mostrou ter 4 inserções, é mais correto inferir que este evento possui de 2-4 cópias em hemizigose, sendo que, em uma das quatro inserções, possivelmente duas cópias podem ter sido inseridas em tandem, ou seja em regiões próximas do genoma. Isso pode ser observado na diferença de intensidade das bandas que caracterizaram as inserções nesta planta (Figura 16).

Analisando a geração T₁ dessa mesma planta A2639, e comparando com os dados obtidos por *Southern blot* (Figura 16), pode se inferir que seus descendentes possuem de 4-6 quantidade de transgene, e de 4 a 5 inserções, o que indica que os descendentes possuem de 2-4 cópias por genoma haploide.

Para as demais descendências T_1 deste evento, identificadas como 2639-14, 2639-24, 2639-28, 2639-31 e 2639-34 não foi possível avaliar o número de insertos pela técnica de *Southern blot*, pois, as digestões foram incompletas, assim os dados obtidos são provenientes apenas da técnica de qPCR, e por isso não puderam ser correlacionados.

Quando a produção de sementes T_2 foi comparada, entre os descendentes T_1 deste evento, uma produção relativamente baixa de sementes T_2 foi observada para as plantas: 2639-22 que produziu 9 sementes, 2639-34 gerou 10 sementes, 2639-1 rendeu 12 sementes e 2639-31 produziu 26 sementes.

Para o evento T_0 2651, o número de insertos (2) não foi igual à quantidade de transgene (1). Com isso, uma nova análise deve ser feita para esta planta, pois, um resultado mais preciso deve ser alcançado, uma vez que o número de inserções nunca deve ser maior que o número de cópias.

Analisando a geração T_1 dessa planta, pode se inferir que seus descendentes possuem de 2-5 quantidade de transgene e de 2-4 inserções, o que indica que estas plantas possuem de 2-4 cópias por genoma haploide. Em especial, o evento 2651-4 apresentou 4 inserções e 25 vezes mais quantidade de transgene que o calibrador lectina. Logo este possui de 12 a 13 cópias por genoma haploide. Este resultado pode ser explicado pela ocorrência de complexas recombinações do transgene no processo de autofecundação desta planta.

Para os descendentes T_1 deste evento, 2651-1, 2651-16, 2651-17, 2651-18 e 2651-32 não foi possível avaliar o número de insertos pela técnica de *Southern blot*, pois, as digestões foram incompletas, sendo os dados obtidos apenas via qPCR. Quando a produção de sementes dos descendentes do evento T_0 2651 foi considerada, no geral a produção de sementes T_2 não foi muito afetada.

Para o evento T_0 2654, o número de insertos (4) não foi igual a quantidade de transgenes (12). Neste caso em especial, a forte intensidade das bandas no gel que representam as quatro inserções, indica que várias cópias foram inseridas em tandem ou em regiões próximas no genoma dessa planta, sendo que, apenas a visualização em gel seria impossível para afirmar a quantidade de cópias introduzida nestas plantas.

Segundo MASON et al., (2003) e SHOU et al., (2004) pode existir uma certa incompatibilidade nos resultados das técnicas de *Southern blot* e qPCR quando as plantas apresentam um alto número de cópias, o que ocorreu com o evento 2654. Entretanto o evento 2654 T₀ e seus descendentes T₁ apresentaram o mesmo padrão de bandas. Segundo LI et al., (2011), um padrão de bandas semelhantes identificados em plantas da geração T₀ e T₁ pode indicar a não ocorrência de hibridização de bandas ou seja, que não ocorreu recombinação dos insertos da primeira para a segunda geração, e que múltiplos insertos em um genoma são transmitidos dentro de um mesmo locus genético. Entretanto, para este estudo não foi possível aplicar este princípio, pois, a quantidade de transgene em alguns parentais variou, e em alguns esta foi maior que 24, ou seja, eles apresentaram duas vezes mais quantidade de transgene que a planta T₀ 2654, o que indica que recombinações podem ter ocorrido.

O descendente T₁ 2654-17 não foi avaliado pelo método de *Southern blot*, pois a digestão do material biológico foi incompleta. No geral, os outros descendentes deste evento apresentaram muitas cópias do transgene. A planta 2654-3, por exemplo, teve 4 inserções e 34 vezes a quantidade de transgene ou seja 17 vezes mais transgenes que o calibrador lectina, o que indica que esta planta possui 17 cópias. Para a planta 2654-12 os dados mostraram 4 inserções e 32 vezes a quantidade do transgene, indicando que esta planta possui 16 vezes mais quantidade do transgene que o calibrador, logo 16 cópias. O descendente 2654-14 teve 4 inserções e 23 vezes a quantidade de transgene, o que indica que esta planta tem 11,5 mais quantidade de transgene que o calibrador, logo aproximadamente de 11 a 12 cópias. E finalmente, o descendente 2654-16 teve 4 inserções e 27 vezes a quantidade de transgene, ou seja 13,5 mais transgene que o calibrador, logo esta planta possui, aproximadamente, de 13-14 cópias. A produção de sementes neste evento foi bastante comprometida. Na tabela 6 está representada a caracterização molecular quanto ao número de inserções, quantidade de transgene, número de cópias e produção de sementes dos eventos 2639, 2651 e 2654.

Tabela 6. Caracterização dos eventos 2639, 2651 e 2654 e seus descendentes

	Número de inserções por <i>Southern blot</i>	Quantidade do transgene por RT-qPCR	Número de cópias	Produção de sementes T ₂
2639 T₀	4	5	2-4	62
2639-1	5	5	2-4	12
2639-11	5	5	2-4	35
2639-14	?	5	2-4	55
2639-15	4	5	2-4	37
2639-22	4	6	3	9
2639-24	?	5	2-4	61
2639-28	?	4	2	43
2639-31	?	4	2	26
2639-34	?	1	1	10
2651 T₀	2	1*	?	35
2651-1	?	5	?	26
2651-2	3	3	2-3	34
2651-4	4	25*	12-13	80
2651-7	2	2	?	68
2651-16	?	3	?	80
2651-17	?	2	?	54
2651-18	?	2	?	69
2651-19	2	4	2	65
2651-27	2	3	2	79
2651-28	2	3	2	60
2651-31	3	5	2-4	68
2651-32	?	3	?	77
2651-33	2	2	?	31
2651-35	2	3	2	11
2654 T₀	4	12	12	20
2654-3	4	34	17	25
2654-12	4	32	16	36
2654-14	4	23	11-12	24
2654-16	4	27	13-14	17
2654-17	?	31	?	6

?: Não pode ser estimado

4.4. Expressão relativa do gene *AtAREB1*Δ*QT* em plantas T₁

Pela presença no cassete de expressão do promotor constitutivo 35S, fortemente reconhecido pelo complexo basal de transcrição, era esperado que as linhagens GMs apresentassem uma super-expressão do transgene quando comparado a um gene de expressão basal constitutivo (normalizador). Por esta razão, a amostra de menor nível de expressão gênica entre todos os eventos foi utilizada como amostra calibradora. Este evento foi o 2639-34 que quando inicialmente comparado com a cultivar convencional BR16 (não transgênica), apresentou uma expressão gênica de 164,49 vezes a mais que o calibrador. Os genes *AtAREB1* e *Gmβ-actina* amplificaram com eficiências próximas, de 80 e 88%, respectivamente.

O nível da expressão relativa do transgene *AtAREB1ΔQT* foi analisado em 28 plantas da geração T₁ provenientes dos eventos T₀ A2639, A2651 e A2654. Os resultados mostraram que o gene alvo foi expresso em todas as amostras testadas, entretanto o nível da expressão foi bastante variável entre os eventos, e plantas do mesmo evento (Gráfico 1).



Gráfico 1. Expressão relativa dos 28 eventos T₁ provenientes dos eventos 2639, 2651 e 2654. Os parentais com maior expressão 2639-14, 2651-2 e 2654-17 foram selecionados para experimentos futuros para analisar o efeito deste transgene na resposta da planta ao déficit hídrico.

O maior nível de expressão relativa do gene alvo foi detectado nos eventos T₁ 2654-17, de 448 vezes (identificado como contendo de 15-16 cópias) e 2654-14, de 330,57 vezes (identificado como contendo de 11-12 cópias) ambos descendentes da planta T₀ 2654, que teve o maior número de cópias inseridas (12 cópias) identificada neste estudo. Em especial sobre o evento 2654-17, que não foi avaliado pelo método de *Southern blot*, mas, baseado no resultados da expressão e nos dados da quantificação por qPCR, pode-se inferir que este evento teve de 15-16 cópias, e ainda o

local da inserção dessas múltiplas cópias no genoma vegetal não interferiu na expressão do gene alvo, ou seja, o gene não foi silenciado.

Uma expressão significativa também foi observada nos descendentes das plantas T₀ 2639 e 2651. Interessantemente, uma menor expressão de 164,49 vezes do gene alvo foi detectada no evento 2639-34 (identificado como contendo 1 cópia) que apresentou o menor número de cópias entre todos os eventos T₁ avaliados.

Com base nos resultados de número de cópias inseridas, do nível de expressão do transgene e da produção de sementes, alguns eventos da geração T₁, foram selecionados para avaliar o efeito do transgene no genoma da soja sob condição de déficit hídrico. Os eventos selecionados foram: 2639-14 (2-4 cópias), 2651-2 (2-3 cópias) e 2654-14 (11-12 cópias). O evento 2639-14 não foi avaliado pelo método de *Southern blot*, porém a alta expressão gênica e os dados de quantificação de número de cópias em relação à quantidade do transgene indicou este evento como promissor.

Diferentes níveis de expressão gênica do transgene podem resultar em respostas diversas no vegetal quando submetidas a condições de estresse. Por esta razão, os eventos GMs selecionados serão avaliados mais detalhadamente quanto a suas respostas moleculares e fisiológicas em condições de déficit hídrico, com o intuito de se verificar se a presença desse fator de transcrição está aumentando a tolerância à seca nestas plantas.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, plantas de soja transformadas por biobalística com a construção *35S:AtAREB1ΔQT* foram obtidas e uma eficiência de transformação de 0,59% foi alcançada, sendo esta considerada baixa para soja se comparada à eficiência de 9% obtida por (RECH et al., 2008). No entanto, dados de literatura indicam que a inserção de qualquer gene exógeno via biobalística depende de muitas variáveis, por exemplo, a cultivar e a manutenção periódica do equipamento, que podem influenciar diretamente na eficiência do processo de transformação (DROSTE et al., 2002); (JOSHI et al., 2011). A cultivar utilizada neste trabalho foi a BR16 diferente da usada no trabalho de RECH et al., (2008), que utilizou a cultivar Conquista.

A taxa de 0% de eficiência alcançada para a inserção do gene de seleção *ahas* é um resultado pouco comum e pode ser explicado por algumas hipóteses. As construções gênicas utilizadas neste trabalho são discrepantes em tamanho em mais 4.100 pb, uma vez que, o plasmídeo do gene de interesse *35S:AtAREB1ΔQT* possui 4.486 pb e do gene marcador *ahas*, 8.673 pb. Esta diferença pode gerar, no momento da introdução, uma competição entre os plasmídeos a nível celular, pois, plasmídeos menores tendem a ser introduzidos com maior frequência no genoma hospedeiro que plasmídeos maiores. Outro fator a ser considerado é que visando um melhor enraizamento e recuperação das plantas, uma concentração de 2,5x menor do agente seletivo imazapir foi utilizada no processo de seleção dos tecidos transformados em relação ao protocolo estabelecido RECH et al., (2008), o que pode ter resultado em um escape maior do que o esperado, dificultando a seleção dos tecidos transgênicos. Outra hipótese a ser considerada é que plantas *ahas* positivas devem ter sido geradas, mas, como as plantas transformadas eram primeiramente avaliadas para a presença do gene de interesse *AtAREB1ΔQT*, plantas positivas para o gene marcador não foram identificadas.

A caracterização molecular dos eventos após a obtenção das plantas GMs é de fundamental importância, uma vez que o número de cópias pode influenciar

diretamente na expressão do transgene, dependendo do local e quantidade de inserção. Neste estudo, um total de 12 plantas estáveis (não quiméricas) foram obtidas com a construção *35S:AtAREB1ΔQT*, entretanto 9 eventos não transmitiram o transgene para a próxima geração. Algumas hipóteses podem explicar este resultado. ROMANO et al., (2005) caracterizaram molecularmente alguns eventos GMs por mais de dois anos, e concluíram que os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação de transgenes de um geração para outra envolvem recombinações intracromossomais, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido e co-eliminação dos transgenes ativada por algum processo de defesa do genoma vegetal.

Esses fatos podem explicar os resultados observados neste trabalho, pois, nos eventos 822 e 2769 foram inseridas múltiplas cópias, respectivamente 8 e 4 cópias, que podem ter resultado na formação de rearranjos complexos levando a perda do transgene. Ainda, no processo de caracterização molecular desses eventos a quantidade do transgene nas plantas T_0 não foi igual ao número de inserções. Este resultado indica que pode ter ocorrido a inserção de cópias invertidas em tandem, que na metodologia de *Southern blot* aparecem como uma única banda hibridizada de maior intensidade e de mesmo tamanho, indicando maior quantidade do transgene, ou mais de uma cópia em uma mesma inserção, (LI et al., 2004). Nos demais eventos T_0 avaliados a não transmissão do gene alvo pode ser resultado do local de inserção no genoma, instabilidades genéticas e processos de defesa da planta, eliminando o DNA exógeno.

Comparando todos os eventos independentes gerados neste trabalho, os resultados de quantificação do número de cópias indicaram eventos com um baixo número de cópias, como no caso da planta 2639-34, que teve 1 única cópia inserida, até plantas com muitas cópias, como no caso do evento 2654-3 que apresentou 17. Esse dado sugere que embora o método de biobalística tenda a introduzir múltiplas cópias no genoma vegetal, é possível obter plantas com apenas 1 cópia. Em estudos onde se deseja analisar a expressão de genes sob condições de estresse é muito importante à presença de poucas cópias, pois múltiplas cópias do transgene podem levar à

desarranjos cromossômicos no genoma, silenciamento gênico e outros efeitos que dificultam a interpretação da real interação entre os produtos gênicos.

Neste estudo, pode-se verificar também que gene o introduzido *AtAREB1ΔQT* foi expresso em todos os 28 eventos T_1 provenientes dos eventos T_0 2639, 2651 e 2654 independentemente do número de cópias inseridas. Dessa forma, pode se inferir que o local de integração do transgene não afetou a expressão mesmo nos eventos com múltiplas cópias. Entretanto, no evento T_0 2654 e em seus descendentes T_1 , caracterizados com um alto número de cópias, a produção de sementes T_2 foi menor, quando comparados com os dois outros eventos T_0 (2639 e A2651). Ainda, a planta 2654-14 apresentou retardo no crescimento quando comparada com as plantas negativas desse do mesmo evento e também com as plantas positivas dos eventos T_1 2639 e 2651.

O fenótipo diferencial de folhas enrugadas, e sementes verdes, apresentado pela planta 2651-31, pode ser explicado devido à ocorrência complexas recombinações no processo de autofecundação. Isso pode ser observado na alta intensidade da banda no gel do *Southern blot*, que não foi corretamente quantificado pelo método de qPCR.

Embora os eventos T_0 2639, 2651 e 2654 tenham transmitido o gene para a geração T_1 , a segregação do transgene não ocorreu conforme a lei de Mendel 3:1 esperada, apresentando todos, ao contrário, uma segregação complexa. Segundo YAN et al., (2007), plantas transformadas por biobalística tendem a apresentar uma segregação diferenciada, por isso, para que se possa inferir dados mais confiáveis sobre a herança desses genes exógenos, análises por gerações sucessivas são necessárias.

O método de quantificação relativa utilizado neste estudo (método $2^{-\Delta C_t}$) consiste em uma derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e foi proposto por ROLLA, (2009). Neste método não é necessária à calibração com uma amostra previamente caracterizada com uma cópia por genoma haplóide, pois, se utiliza o próprio gene endógeno (com uma cópia/genoma haplóide) como calibrador. Os resultados apresentados sugerem que esta metodologia é eficiente, desde que validada por um bom delineamento da reação e posteriormente por *Southern blot* (para número

de insertos e cópias) ou *Northern blot* para tratamentos sob estresse (para expressão gênica relativa). Para fins de um *screening* inicial, categorização e seleção de eventos com diferentes números de cópias e níveis relativos de expressão do transgene, essa é uma metodologia de alto potencial, uma vez que necessita de pequenas quantidades de material biológico, além de ser um protocolo automatizado, eficiente e rápido.

Considerando os resultados obtidos para número de cópias e nível relativo de expressão gênica, 3 eventos candidatos considerados promissores foram selecionados. Os eventos selecionados apresentaram resultados contrastantes o que pode induzir a diferentes respostas em condições de tratamento por estresse. O evento selecionado 2639-14 possui alta expressão relativa e baixo número cópias (2-4), assim também como o evento 2651-2 (2-3 cópias). Entretanto, esses serão comparados com o evento 2654-14, que apresentou de uma expressão relativa alta de 330,57 e um alto número de cópias (11-12).

Estes dados são importantes, pois através deles será possível testar o efeito deste fator de transcrição na soja em condições de estresse hídrico. A superexpressão dos genes presentes dentro da rede regulatória controlada pelo fator de transcrição *AtAREB1ΔQT*, dirigida pelo promotor constitutivo 35S, introduzidos em soja, induzirá diferentes repostas vegetais a níveis moleculares, agrônômicos e fenotípicos dentro de cada evento GM, resultado da ativação da cascata gênica de resposta ao ABA e ao déficit hídrico.

Com o avanço da biotecnologia, o uso de fatores de transcrição como o *AtAREB1ΔQT* tornou-se mais uma ferramenta no entendimento dos complexos mecanismos de defesa que ocorrem a nível celular nas plantas em condições de estresses abióticos, como a seca. Diversos fatores de transcrição têm sido introduzidos em plantas modelo, e também em culturas de interesse agrônômico, com a finalidade de avaliar o potencial desses genes em aumentar a tolerância aos estresses impostos pelo ambiente, como seca, alta salinidade e frio. GAO et al., (2011) super-expressaram o gene *GmbZIP1* em trigo, tabaco e *Arabidopsis*, e as plantas GMs obtidas foram mais tolerantes ao déficit hídrico e à outros estresses abióticos.

Contudo, estudos adicionais que visam entender mais detalhadamente as redes regulatórias vegetais em resposta aos estresses abióticos devem ainda ser realizados, por esta razão é de grande importância a realização de trabalhos de pesquisa básica como este onde o fator de transcrição *AtAREB1 Δ QT* foi inicialmente introduzido em soja e futuramente sua funcionalidade, em condições de estresse, será avaliada. Estes dados auxiliarão no delineamento de estratégias para o desenvolvimento de culturas mais tolerante aos estresses abióticos, uma característica genética sabidamente de difícil manipulação em plantas, e que foi e ainda é responsável por grandes perdas na produção de várias culturas importantes de alto interesse agrônomo, fundamentais na alimentação da população mundial crescente.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidas via biobalística plantas de soja geneticamente modificadas com a forma constitutiva ativa *AtAREB1ΔQT* do fator de transcrição *AtAREB1*, sendo a eficiência de transformação obtida de 0,59%.

De um total de 21 plantas identificadas como positivas na geração transformada, apenas três eventos, identificados como 2639, 2651 e 2654 transmitiram o transgene para a primeira geração.

A segregação na geração T₁, no entanto, não seguiu o padrão Mendeliano de 3:1 esperado. Para se obter eventos mais estáveis, as plantas serão avaliadas por consecutivas gerações.

A caracterização molecular quanto ao número de inserções via *Southern blot*, número de cópias e análise da expressão relativa via RT-qPCR, indicou que o transgene foi inserido independentemente nos eventos obtidos com número de inserções, cópias e nível de expressão gênica variável nas linhagens analisadas.

Com base nos resultados, 03 eventos considerados promissores foram selecionados, 2639-14, 2651-2 e 2654-14. Estes eventos serão avaliados mais detalhadamente em experimento futuro, visando entender o efeito deste transgene na soja como também a complexa rede regulatória de resposta induzida por este fator de transcrição sob condições de déficit hídrico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE: Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/exporta_br.html> acesso em 03 de janeiro de 2012.

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.

BENSMIHEN, S.; RIPPA, S.; LAMBERT, G.; JUBLOT, D.; PAUTOT, V.; GRANIER, F.; GIRAUDAT, J.; PARCY, F. The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to finetune gene expression during late embryogenesis. **Plant Cell**, v. 14, p. 1391-1403, 2002.

BHAT, S. R.; SRINIVASAN, S. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: considerations and approaches. **Plant Science**, v. 163, p. 673-681, 2002.

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

BUSK, P. K.; PAGES, M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 425-435, 1998.

CASARETTO, J.; HO, T-HD. The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are required for the abscisic acid induction of gene expression in barley aleurone cells. **Plant Cell**, v. 15, p. 271-284, 2003.

CHEN, H.; ZHANG, J.; NEFF, M. M.; HONG, S. W.; ZHANG, H.; DENG, X. W.; XIONG, L. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early

seedling development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105 p. 4495-4500, 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf> acesso em: 07 de fevereiro de 2012.

CORRÊA, L. G.; RIANO-PACHON, D. M.; SCHRAGO, C. G.; DOS SANTOS, R. V.; MUELLER-ROEBER, B.; VINCENTZ, M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **PLoS One**, v. 3, n. 8, 2008.

DESCLAUX, D.; ROUMET, P. Impact of drought stress on the phenology of two soybean cultivars. **Field and Crops Research**, v. 46, p. 61-70, 1996.

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

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

DROSTE, A.; LEITE, P. C. P.; PASQUALI, G.; MUNDSTOCK, E. C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Regeneration of soybean via embryogenic suspension culture. **Scientia Agrícola**, v. 58, p.753-758, 2001.

EAPEN, S. Advances in development of transgenic pulse crops. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 162-168, 2008.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17> acesso em: 03 de janeiro de 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29> acesso em: 08 de agosto de 2011.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 2008. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/junho/2a-semana/levantamento-quantifica-perdas-na-soja-no-rs/>> acesso em: 2009.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br> acesso em: 2005.

FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. **Seca**: soja em carência de água. Disponível em: <<http://bioinfo.cnpso.embrapa.br/seca/index.php/ecofisiologia/exigencias-climaticas>> Acesso em: 01 de fevereiro de 2011.

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In: **Vitro Cellular Developmental Biology**, v. 27, p.175-182, 1991.

FOSTER, R.; IZAWA, T.; CHUA, N. H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. **Faseb Journal**, v. 8, p. 192-200, 1994.

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

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, p. 1-17, 2011.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 17 p. 3470-3488, 2005.

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

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

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

HATTORI, T.; TOTSUKA, M.; HOBO, T.; KAGAYA, Y.; YAMAMOTO-TOYODA, A. experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 136–140, 2002.

HINCHEE, M. A.; CONNOR-WARD, D. V.; NEWELL, C. A.; MCDONNELL, R. E.; SATO, S. J.; GASSER, C. S.; FISCHHOFF, D. A.; RE, D. B.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*- mediated DNA transfer. **Biotechnology**, v. 6, p. 915-922, 1988.

HOBO, T.; ASADA, M.; KOWYAMA, Y.; HATTORI, T. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. **Plant Journal**, v. 19, p. 679-689, 1999.

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

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

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

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

JICA – Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 01 julho de 2011.

JOHN DEERE. Disponível em: <http://www.deere.com.br/pt_BR/ag/veja_mais/info_mercado/soy.html> Acesso em: 01 de julho de 2011.

JOHNSON, R. R.; WAGNER, R. L.; VERHEY, S. D.; WALKER-SIMMONS, M. K. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid

response element binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. **Plant Physiology**, v. 130, p. 837-846, 2002.

JORNAL PORTAL DO PARANÁ. Disponível em: <<http://www.jornalportaldoparana.com.br/index2.php?ctg=28&nt=15701>> Acesso em: 10 de fevereiro de 2012.

JOSHI, M.; MISHRA, A.; JHA, B. Efficient genetic transformation of *Jatropha curcas* L. by microprojectile bombardment using embryo axes. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 67-77, 2011.

KIM, S. Y.; MA, J.; PERRET, P.; LI, Z.; THOMAS, T. L. *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. **Plant Physiology**, v. 130, p. 688–697, 2002.

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

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2129-2141, 2002.

LAU, E. Y. Biotecnologia: a transgenia e os avanços na aceitação. Disponível em:<http://www.agrolink.com.br/biotecnologia/artigo/a-transgenia-e-os-avancos-na-aceitacao_102393.html> Acesso em: 17 de novembro de 2011.

LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MAS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **Embo Journal**, v. 28, p. 3745-3757, 2009.

LI, R.; BANCROFT, B.; HUTCHEON, C.; ZHAO, S.; BLAHUT-BEATTY, L.; DE ROCHER, J.; SIMMONDS, D. Multiple inserts of gene of interest and selectable marker gene are co-integrated and stably transmitted as a single genetic locus in transgenic soybean plants. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 47, p. 274-281, 2011.

LI, Z.; HANSEN, J. L.; LIU, Y.; ZEMETRA, R. S.; BERGER, P. H. Using Real-Time PCR to Determine Transgene Copy Number in Wheat. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.22, p. 179-188, 2004.

LIAO, Y.; ZOU, H. F.; WEI, W.; HAO, Y. J.; TIAN, A. G.; HUANG, J.; LIU, Y. F.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Planta**, v. 228, p. 225-240, 2008a.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MASON, G.; PROVERO P.; VARIA A. M.; ACOTTO G. P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, v. 2, p. 20, 2003.

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

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research, Standford**, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Revista Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**. Edição 33, p. 10-13, 2004.

OSOSKI, A. L.; KENNELLY, E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 84-86, 2003.

PARROT, W. A.; HOFFMAN, L. M.; HILDEBRAND, D. F.; WILLIAMS, E. G.; COLLINS, G. B. Recovery of primary transformants os soybean. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 615-617, 1989.

PETHERICK, A. High hopes for Brazilian science. Published online 9 June 2010. **Nature**, v. 465, p. 674-675, 2010.

POLIZEL, A.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; MARIN, S. R. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F.A.; STOLF, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A. P.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a

genetically modified soybean line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, 2011.

PRABU, G.; KAWAR, P. G.; PAGARIYA, M. C.; PRASAD, D. T. Identification of water deficit stress up regulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 291-304, 2011.

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

ROLLA, P. A. A. **Desenvolvimento e validação de um método de determinação do número de cópias transgenes no genoma da soja por PCR quantitativo**. 150 p. Dissertação de mestrado (Universidade Estadual de Londrina/PR), p. 150, 2009.

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

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

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. D.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR,

D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, p. 178-83, 2010.

SHEARD, L. B.; ZHENG, N. Signal advance for abscisic acid: The hunt for the receptor for abscisic acid, initially marked by false starts and lingering doubts, has met with success. Converging studies now reveal the details of how this plant hormone transmits its message. **Nature**, v. 462, p. 575-576, 2009.

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

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

SHOU, H.; FRAME, B. R.; WHITHAM, S. A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**, v.13, p.201-208, 2004.

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

SUZUKI, M.; KETTERLING, M. G.; LI, Q. B.; MCCARTY, D. R. Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1664–1677, 2003.

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

TRICK, H. N.; FINNER, J. J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L) Merrill) embryogenic suspension culture tissue. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 482-488, 1998.

TRICK, H. N.; DINKINGS, R. D.; SANTARÉM, E. R.; SAMOYLOV V.; MEURER, C. A.; WALKER, D. R.; PARROTT, W. A.; FINNER, J. J.; COLLINS, G. B. Recent advances in soybean transformation. **Plant Tissue Culture Biotechnology**, v. 3, p. 9-24, 1997.

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

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences the USA**, v. 97, p. 632-637, 2000.

WENG, H.; PAN, A.; YANG, L.; ZHANG, C.; LIU, Z.; DABING ZHANG, D. Estimating Number of Transgene Copies in Transgenic Rapeseed by Real-Time PCR Assay With *HMG I/Y* as an Endogenous Reference Gene. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 289–300, 2004.

WIEBKE-STROHM, B.; DROSTE, A.; PASQUALI, G.; OSORIO, M. B.; BUCKER-NETO, L.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENCKE, M.; HOMRICH, M. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Transgenic fertile soybean plants derived from somatic

embryos transformed via the combined DNA-free particle bombardment and *Agrobacterium* system. **Euphytica**, v. 177, p. 343-354, 2011.

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

YAN, Z.; QIAN, Q.; HUIZHONG, W.; DANIAN, H. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment. **JGG**, v. 34, n. 9, p. 824-835, 2007.

YAN, B.; SRINIVASA, R. M. S.; COLLINS, G. B. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean (*Glycine max*) (L) Merrill using immature zygotic cotyledon explants. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1090-1097, 2000.

VIII. ANEXO

Cálculo do número de cópias

Repetições	Identificação	Valores de Ct		Delta Ct	Média do dCt	2 ^{^-dct}
		Alvo	Endógeno			
A1	193-DQT	20,89	22,03	-1,14	-1,31	2
A2		20,63	22,08	-1,45		
A3		20,76	22,11	-1,35		
B1	673-DQT	22,51	23,67	-1,16	-1,21	2
B2		22,58	23,79	-1,21		
B3		22,5	23,76	-1,26		
C1	822-DQT	18,81	23,08	-4,27	-4,18	16
C2		18,8	22,86	-4,06		
C3		18,87	23,07	-4,2		
D1	895-DQT	21,14	22,19	-1,05	-0,92	2
D2		21,24	22,02	-0,78		
D3		21,15	22,07	-0,92		
E1	2619-DQT	20,28	22,1	-1,82	-1,55	3
E2		20,84	22,16	-1,32		
E3		20,62	22,13	-1,51		
F1	2651-DQT	21,62	22,04	-0,42	-0,41	1
F2		21,47	21,85	-0,38		
F3		21,69	22,12	-0,43		
G1	2654-DQT	19,26	23,12	-3,86	-3,81	12
G2		19,44	23,35	-3,91		
G3		19,06	22,71	-3,65		
H1	2658-DQT	20,64	22,56	-1,92	-2,08	4
H2		20,36	22,57	-2,21		
H3		20,03	22,15	-2,12		
A4	2639-DQT	20,09	22,42	-2,33	-2,40	5
A5		20,17	22,59	-2,42		
A6		20,2	22,65	-2,45		
B4	2769-DQT	20,4	23,51	-3,11	-3,20	8
B5		20,4	23,65	-3,25		
B6		20,41	23,64	-3,23		
A1	2651.01	21,23	23,56	-2,33	-2,27	5
A2		21,23	23,42	-2,19		
A3		21,2	23,5	-2,3		
A4	2651.27	21,82	23,14	-1,32	-1,49	3

A5		21,59	23,12	-1,53		
A6		21,68	23,31	-1,63		
B1	2651.02	21,56	23,42	-1,86	-1,86	3
B2		21,72	23,46	-1,74		
B3		21,5	23,48	-1,98		
B4	2651.28	21,5	23,05	-1,55	-1,52	3
B5		21,58	22,97	-1,39		
B6		21,52	23,13	-1,61		
C1	2651.04	19,7	25,06	-5,36	-4,84	25
C2		19,68	24,61	-4,93		
C3		19,76	24,51	-4,75		
C4	2651.31	20,49	22,51	-2,02	-2,33	5
C5		20,94	23,25	-2,31		
C6		20,79	23,46	-2,67		
D1	2651.07	21,65	22,32	-0,67	-1,01	2
D2		21,17	22,31	-1,14		
D3		21,23	22,45	-1,22		
D4	2651.32	21,96	23,43	-1,47	-1,55	3
D5		22,2	23,73	-1,53		
D6		22,13	23,77	-1,64		
E1	2651.16	21,32	23,11	-1,79	-1,52	3
E2		21,86	23,22	-1,36		
E3		21,63	23,03	-1,4		
E10	2651-33	21,64	23,12	-1,48	-1,32	2
E11		22,17	23,33	-1,16		
E12		21,74	23,06	-1,32		
E4	2651.35	21,21	22,76	-1,55	-1,56	3
E5		21,54	23,16	-1,62		
E6		21,38	22,89	-1,51		
F1	2651.17	22,1	23,3	-1,2	-1,19	2
F2		22,07	23,22	-1,15		
F3		21,91	23,14	-1,23		
G1	2651.18	20,4	21,82	-1,42	-1,36	2
G2		20,9	22,05	-1,15		
G3		20,66	22,16	-1,5		
H1	2651.19	21,47	23,49	-2,02	-2,20	4
H2		21,55	23,83	-2,28		
H3		21,32	23,63	-2,31		
F4	2654.03	19,04	24,22	-5,18	-5,32	34
F5		19,61	24,9	-5,29		

F6		19,24	24,74	-5,5		
A7	2654.12	19,22	24,43	-5,21	-5,22	32
A8		19,69	25,07	-5,38		
A9		19,28	24,35	-5,07		
B7	2654.14	19,5	24,43	-4,93	-4,70	23
B8		19,96	24,49	-4,53		
B9		19,58	24,23	-4,65		
C7	2654.16	19,9	24,98	-5,08	-4,96	27
C8		20,24	25,34	-5,1		
C9		20,02	24,71	-4,69		
A10	2639.22	20,13	22,76	-2,63	-2,59	6
A11		20,57	23,02	-2,45		
A12		20,27	22,96	-2,69		
B10	2639.24	20,18	22,37	-2,19	-2,38	5
B11		20,42	22,86	-2,44		
B12		20,39	22,91	-2,52		
C10	2639.28	20,03	22,22	-2,19	-2,15	4
C11		20,59	22,7	-2,11		
C12		20,33	22,48	-2,15		
D7	2639.01	20,38	23,23	-2,85	-2,51	5
D8		21,03	23,44	-2,41		
D9		20,62	22,89	-2,27		
D10	2639.31	20,19	22,48	-2,29	-2,26	4
D11		20,68	22,98	-2,3		
D12		20,49	22,68	-2,19		
E7	2639.11	20,35	22,74	-2,39	-2,43	5
E8		21,22	23,72	-2,5		
E9		20,49	22,88	-2,39		
E10	2639.33	21,64	23,12	-1,48	-1,32	2
E11		22,17	23,33	-1,16		
E12		21,74	23,06	-1,32		
F7	2639.14	19,42	22,09	-2,67	-2,55	5
F8		20,7	23,19	-2,49		
F9		20,16	22,65	-2,49		
F10	2639.34	22,42	22,36	0,06	-0,04	1
F11		23,29	23,29	0		
F12		23,01	23,19	-0,18		
G7	2639.15	20,57	23,1	-2,53	-2,34	5
G8		21,38	23,56	-2,18		
G9		21,12	23,44	-2,32		

H7	2639.17	21,11	26,38	-5,27	-5,18	31
H8		22,3	27,18	-4,88		
H9		21,67	27,06	-5,39		