



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Superexpressão do gene desidrina de *Arachis duranensis*
em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana***

Thaís Nicolini de Oliveira

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams
Coorientadora: Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro

Brasília – DF

Abril/2016



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Superexpressão do gene desidrina de *Arachis duranensis*
em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana***

Thaís Nicolini de Oliveira

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams
Coorientadora: Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília – DF

Abril/2016

Dissertação de autoria de Thaís Nicolini de Oliveira, intitulada “Superexpressão do gene desidrina de *Arachis duranensis* em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*”, realizada junto ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Professor Thomas Christopher Rhys Williams, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF).

Aprovado por:

Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams (Orientador)

Departamento de Botânica

Universidade de Brasília

Prof. Dra. Cristiane da Silva Ferreira (Examinadora)

Departamento de Botânica

Universidade de Brasília

Dr. Cristiano Castro Lacorte (Examinador)

Laboratório de Biologia Sintética

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Departamento de Botânica

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

À Deus, à minha mãe, Vera Regina, aos meus irmãos, Daniel, Renata e Marcelo, aos amigos, professores e orientadores, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que eu tenho certeza que sempre me acompanha nos diversos caminhos que a vida toma.

À minha mãe, Vera Regina, que diante de todas as dificuldades, conseguiu me dar todo amor e apoio necessários para que eu alcançasse meus objetivos e chegasse onde estou hoje. E aos meus irmãos, Daniel, Renata e Marcelo, que mesmo de longe estão sempre presentes na minha vida.

Aos orientadores, Dra. Ana Brasileiro e Dr. Thomas Williams, que idealizaram esse projeto, iluminaram minhas ideias e me ensinaram a ser mais crítica.

À Dra. Patrícia Guimarães e à Dra. Ana Cláudia Guerra, que por meio das reuniões semanais também me deram muitas idéias e ajudaram no processo de entendimento e assimilação da Biologia Molecular.

Aos amigos do Laboratório de Interação Planta-Praga III, que fizeram com que a rotina do laboratório se tornasse mais leve e divertida.

Às amigas, Paula Carvalho e Amanda Kristina, que foram minhas melhores parceiras durante pelo menos metade do mestrado, dividindo comigo sentimentos que somente nós sabemos que sentimos, me proporcionando momentos e conselhos que levarei para sempre comigo.

À amiga Andressa Martins, que me acompanha desde a graduação e se tornou uma grande amiga ao longo dos anos. Uma amizade que foi construída pelos nossos objetivos em comum e pela grande sinergia entre nós. As frequentes demonstrações de que eu poderia contar com ela para o que der e vier me ajudaram a seguir até o fim desse projeto. Sou muito grata por Deus ter colocado na minha vida uma amiga tão inteligente, sensível, prestativa e, principalmente, parceira em tudo!

À amiga Ana Zotta, que sempre demonstrou todo seu carinho me ajudando no que fosse preciso, compartilhando seus conhecimentos e verdadeira amizade.

À Dra. Christina Vinson, que me ensinou quase tudo que sei sobre Arabidopsis, e que enfrentou comigo todos os obstáculos na implementação de ensaios e cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

À Dra. Larissa Arrais, que me ensinou muito com sua loucura e empolgação, mostrando o verdadeiro amor e dedicação pela ciência.

Ao analista Mário Saraiva, que sempre se mostrou disponível para resolver qualquer problema que aparecesse no laboratório e fez lindas placas de RT-qPCR, auxiliando para que esse projeto obtivesse resultados corretos.

Ao analista Leonardo Fonseca, que também estava sempre disponível para resolver os problemas do laboratório e que durante certo tempo foi meu conselheiro e psicólogo.

Aos professores do departamento de Botânica da UnB, que contribuíram para que eu pudesse aprofundar meus conhecimentos na área de Botânica, auxiliando no que diz respeito a interpretação de alguns dados obtidos nesse projeto.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF), pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudos.

À Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por disponibilizar as instalações e serviços para que uma ampla parte do projeto fosse realizada.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	6
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Déficit hídrico e seus efeitos na planta	10
2.2. O amendoim silvestre como fonte de alelos de tolerância à seca	11
2.3. Dehidrina	12
2.4. ascorbato peroxidase, galactinol sintase e <i>DREB</i>	13
2.5. <i>Arabidopsis</i> como planta-modelo para transformação genética	14
3. JUSTIFICATIVA	15
4. HIPÓTESES	15
5. OBJETIVOS	15
6. MATERIAL E MÉTODOS	16
6.1. Local de realização dos experimentos	16
6.2. Caracterização do <i>AdDHN</i>	16
6.3. Clonagem do <i>AdDHN</i> no vetor binário pPZP	17
6.5. Transformação e seleção de gerações T1 e T2 de linhagens transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
6.6. Caracterização molecular de linhagens transgênicas T1 de <i>A. thaliana</i>	20
6.7. Análise de expressão de genes relacionados à dehidrina	21
6.8. Ensaio de frio e calor	21
6.9. Ensaio de déficit hídrico	22
6.10. Análise da área foliar	23
6.11. Conteúdo relativo de água nas folhas	23
6.12. Quantificação de açúcares solúveis totais (AST)	23
7. RESULTADOS	23
7.1. Caracterização do gene dehidrina do <i>Arachis duranensis</i>	23
7.2. Transformação do vetor binário em linhagem desarmada <i>A. tumefaciens</i> GV 3101	24
7.3. Transformação de <i>A. thaliana</i> e seleção das gerações T0 até T2	25
7.4. Seleção de linhagens T2 em homozigose	26
7.5. Análises moleculares das plantas transgênicas em geração T2	28
7.6. Ensaio de baixa e alta temperatura, NaCl e manitol	31
7.6.1. Análise da taxa de sobrevivência das plântulas	31
7.6.2. Análise do teor de açúcares solúveis totais	32
7.7. Ensaio de déficit hídrico gradual	33

7.7.1. Análise do fenótipo e da área foliar das plantas submetidas a seca	33
7.7.2. Análise do teor relativo de água	35
7.8. Expressão relativa de ascorbato peroxidase, galactinol sintase e <i>DREB</i> em plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i>	36
8. DISCUSSÃO	39
8.1. Caracterização molecular de <i>AdDHN</i>	39
8.2. Obtenção e caracterização de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> expressando <i>AdDHN</i>	40
8.3. Efeito da superexpressão de <i>AdDHN</i> na resposta ao frio e ao calor	41
8.4. Efeito da superexpressão de <i>AdDHN</i> na resposta ao déficit hídrico	42
8.5. Análise da expressão de ascorbato peroxidase, galactinol sintase e <i>DREB</i> em plantas transgênicas superexpressando <i>AdDHN</i>	44
9. CONCLUSÃO	46
10. PERSPECTIVAS	47
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
12. APÊNDICES	53

RESUMO

Espécies silvestres têm sido exploradas como fonte de alelos de tolerância para o melhoramento genético vegetal de várias culturas. O parental silvestre do amendoim, *Arachis duranensis*, é um genótipo que apresenta alta adaptabilidade ao déficit hídrico e foi utilizado em um ensaio de *dry drown* para sequenciamento do transcriptoma. A análise *in silico* e a validação por RT-qPCR de genes diferencialmente expressos auxiliaram na identificação de genes candidatos associados à resposta a seca. Dentre eles, uma proteína LEA mostrou-se positivamente regulada mediante a esse estresse. Sabe-se que proteínas LEA se comportam como chaperonas e são encontradas em abundância em tecidos sob dessecação, diante disso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar, clonar e introduzir esse gene via transgenia em planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) para compreender os efeitos da sua superexpressão. O gene foi inserido em plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia 0, utilizando o método de *floral dip* e os eventos em homozigose (geração T3) foram testados. As linhagens foram plantadas em placas de meio MS com 150 mM de NaCl e 200 mM de manitol, separadamente, além de outro grupo que foi plantado em meio MS e colocado em temperaturas extremas (-18°C por uma hora e 37°C por oito horas). Foram calculadas as taxas de sobrevivência e o teor de açúcares solúveis totais de cada amostra/ensaio. O teste de seca também foi feito, onde a irrigação foi suspensa por 15 dias e foram feitas análises de área foliar, teor relativo de água e coexpressão de genes relacionados à tolerância a seca. Nos ensaios com NaCl e manitol não houveram diferenças entre as linhagens e as plantas não transformadas, além de ter sido observado desenvolvimento reduzido das plantas. Nos ensaios com temperaturas extremas as linhagens mantiveram seus teores de açúcares iguais ao controle enquanto as não-transformadas (NT) aumentaram seu teor de açúcares solúveis totais apenas no tratamento de calor e sem diferença significativa na taxa de sobrevivência entre as linhagens e NT. No ensaio com seca houve maior desenvolvimento da área foliar em algumas linhagens quando comparadas às plantas NT. Na análise de teor relativo de água as linhagens mostraram maiores teores relativos de água quando comparado à NT, sob condição de rega controlada e após 15 dias sem irrigação, sendo uma linhagem com maior teor significativo. Esse evento foi selecionado para a análise de expressão gênica de três genes coexpressos com a Dehidrina. Houve aumento da expressão dos três genes em diferentes situações, tanto pelo fato da planta superexpressar a AdDHN quanto pela indução da seca. Os resultados sugerem que esse gene possa conferir uma melhor resposta aos estresses abióticos.

Palavras-chave: *Arachis duranensis*, proteína LEA, estresses abióticos, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Wild species have been exploited as a source of tolerance alleles for plant breeding of various cultures. *Arachis duranensis*, a wild parental of the cultivated peanut, is a genotype which has high adaptability to drought and has been used in a dry down test for sequencing the transcriptome. *In silico* analysis and validation by RT-qPCR differentially expressed genes assisted in the identification of candidate genes associated with drought response. Among them, an LEA protein was positively regulated in response to this stress. It is known that LEA proteins behave as chaperones and are found in abundance in tissues under desiccation, therefore, the aim of this study was to characterize, clone and introduce this gene via genetic modification in the model plant *Arabidopsis thaliana*, to understand the effects of its overexpression. The gene was inserted into plants of *A. thaliana*, ecotype Columbia 0, using the floral dip method and homozygous lines (T3 generation) were assayed. The lines were sown on MS medium plates containing either 150 mM NaCl or 200mM mannitol, and another group that was grown in MS medium and placed at extremes temperatures (-18°C for one hour and 37°C for eight hours). Survival rates were calculated and the total soluble sugar content of each sample/test. The dry test was also done where irrigation was suspended for 15 days and analyses were made of leaf area, relative water content, and co-expression of genes related to drought tolerance. In assays with NaCl and mannitol, there were no differences between lines and non-transformed (NT) have been observed in addition to reduced development of plants. In assays with extreme temperatures, lines maintained their sugar content in levels equal to control while non-transformed (NT) increased their total soluble sugar content only under heat treatment, and no significant difference in survival rate between the lines and NT. In assay for drought, there was a greater leaf area development in some lines than in NT plants, while the relative water content analysis of the strains showed higher relative contents of water when compared to NT under controlled irrigation condition and after 15 days without irrigation, with one line showing a significant content. This line was selected for the gene expression analysis of ascorbate peroxidase, galactinol synthase and DREB. There was increased expression of the three genes in different situations, because the plant overexpresses the AdDHN and because the drought induction. The results suggest that *AdDHN* may give a better response to abiotic stresses.

Key-words: *Arachis duranensis*, LEA protein, abiotic stresses, *Agrobacterium tumefaciens*, *Arabidopsis thaliana*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etapas do processo de seleção de plantas transgênicas. A primeira coluna são os eventos obtidos em T0 (1 a 56). A segunda coluna são as linhagens na geração T1 que cada evento T0 deu origem. A terceira coluna são os eventos obtidos em homozigose (não-s segregantes). As células sombreadas significam evento/linhagem que não seguiram para as próximas gerações ou linhagem T2 (terceira coluna) que não foi obtida linhagem em homozigose. 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor pPZP-AdDHN.....	17
Figura 2. Imagem ilustrativa da segregação de plantas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	19
Figura 3. Teste de homozigose em plantas na geração T2 em placas de meio MS com higromicina. Na primeira fileira um controle positivo de plantas de <i>Arabidopsis</i> não-transformadas em Meio MS sem higromicina, na segunda fileira o controle negativo com plantas não-transformadas em meio MS em meio MS com higromicina e nas fileiras restantes sementes T2 de seis diferentes eventos.....	20
Figura 4. Placa de 150x15 mm com meio MS contendo 12 sementes de cada linhagem (ex. L 29.2, L 30.5, L 32.5, L 36.7 e L 40.2) e da planta não-transformada, após uma hora de tratamento a -18°C.....	21
Figura 5. Imagem ilustrativa do desenho experimental do ensaio de seca.....	22
Figura 6. Alinhamento da sequência peptídica deduzida do gene <i>AdDHN</i> por meio da ferramenta ClustalW acessado pelo programa BioEdit entre a Dehidrina de <i>Arachis duranensis</i> e Dehidrinas de outras leguminosas. Em destaque, os domínios conservados (S = SSSSSS, K ₁ = EKKGFLDKIKEKLPG e K ₂ = EKKGILEKIKEKLPG) representando uma Dehidrina do tipo SK2.....	24
Figura 7. Gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio, contendo produtos de amplificação por PCR de eGFP (350pb, verde), VIR (338pb, vermelho) e AdDHN (676pb, amarelo). Cada par de iniciador foi utilizado para a amplificação por PCR a partir do DNA de cada colônia selecionada. Marcador molecular 1Kb Plus (Invitrogen).	25
Figura 8. Resumo ilustrativo das etapas de seleção da geração T0 até T2.....	26
Figura 9. Placa de ELISA contendo meio MS, onde foram semeadas sementes de <i>A. thaliana</i> para seleção de plantas em homozigose. Linha A: sementes com Col 0 não transformadas semeadas em meio MS sem higromicina (controle positivo); Linha B: sementes de Col 0 não transformadas semeadas em meio MS com higromicina (controle negativo); Linhas C a H: sementes em geração T2 derivadas de seis plantas T1 semeadas em meio MS com higromicina. Todas as sementes na linha H germinaram e se desenvolveram, indicando que estas plantas são homozigotas, isto é, não segregaram para a resistência à higromicina.....	27
Figura 10. Planta transgênica (linhagem 11.3) em geração T2 emitindo fluorescência quando exposta ao comprimento de onda próximo ao do UV, devido à expressão do transgene eGFP.	27
Figura 11. Expressão relativa basal do transgene <i>AdDHN</i> de 13 eventos transgênicos de <i>A. thaliana</i> selecionados, em relação ao gene actina de <i>A. thaliana</i> , utilizado como normalizador. Os valores da expressão relativa foram as médias de três replicatas técnicas e as barras indicam o erro padrão. O teste de análise de variância usado foi o ANOVA (P≤0,05).	28
Figura 12. Curva de dissociação da reação de RT-qPCR de 5 plantas, mostrando apenas um produto específico de amplificação do transgene <i>AdDHN</i> (A) e do gene referência actina de <i>A. thaliana</i> (B).	29

Figura 13. Alinhamento da sequência da ORF de *AdDHN* com sequências de cDNA de três diferentes desidrinas presentes em *Arabidopsis thaliana* (AT1G20440, AT3G50980 e AT4G38410). Em destaque (retângulos pretos), estão as regiões nucleotídicas onde foram desenhados os iniciadores para amplificar a ORF de *AdDHN*. 30

Figura 14. Taxa de sobrevivência das plântulas germinadas de 13 linhagens e da planta não-transgênica (NT), 3 dias após o tratamento a -18°C por 1 hora (A) e a 37°C por 8 horas (B). As taxas de sobrevivências estão representadas por barras e o erro padrão das três repetições técnicas pelas linhas verticais. Foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA ($p \leq 0,05$). 32

Figura 15. Teor de açúcares solúveis totais das linhagens (L18.3, L29.2, L32.5, L36.7, L40.2, L42.8 e L.43.4) e da planta não-transgênicas (NT), três dias após o tratamento a -18°C durante 1 hora (barras verdes), a 37°C durante 8 horas (barras vermelhas) e sob condições de luz e temperaturas controles (barras azuis). O erro padrão das três repetições técnicas estão representados pelas linhas verticais em cada barra. O efeito significativo de cada tratamento está indicado por asteriscos, e foi usado Teste-T ($n=3$, $P \leq 0,1$)..... 33

Figura 16. Fenótipo das plantas não transgênicas (NT); primeira linha horizontal) e de quatro linhagens transgênicas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5; 2ª a 4ª linha horizontal), antes da retirada da rega (A), no 15º dia sem irrigação (B) e 2 dias após a reidratação (C)..... 34

Figura 17. Imagem do programa *Rosette Tracker* detectando as rosetas de *A. thaliana* com diferentes cores para cada indivíduo a fim de medir suas áreas foliares. 35

Figura 18. Média das áreas foliares das rosetas de quatro linhagens transgênicas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) e das plantas não-transgênicas (NT) não transgênico antes do estresse e com uma semana de tratamento de déficit hídrico gradual (azul) e com uma semana de tratamento (vermelho). As barras indicam as médias das áreas foliares de 10 plantas e foi usado o teste estatístico de T-Student ($p \leq 0,05$), não apresentando diferença significativa entre plantas transgênicas das quatro linhagens e plantas do controle negativo. 35

Figura 19. A - Média do teor relativo de água em plantas não transgênicas (NT) e quatro linhagens selecionadas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) sob condições controladas de irrigação durante 15 dias (azul) e após 15 dias sem irrigação (vermelho). B – Média do teor relativo de água em plantas não transgênicas (NT) e quatro linhagens selecionadas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) sob condições controladas de irrigação durante 17 dias (azul) e reidratadas após 15 dias de tratamento de seca (vermelho). O asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e o controle negativo, dentro do mesmo tratamento. O erro padrão está representado por linhas verticais e foi usado o Teste T-Student ($n=10$, $P \leq 0,05$)..... 36

Figura 20. Expressão relativa dos genes ascorbato peroxidase (A), galactinol sintase (B) e *DREB* (C) em plantas de *A. thaliana*. A primeira barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 e da planta não-transgênica (NT) sob condições de irrigação normal (CTR). A segunda barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 e da planta não-transgênica (NT) sob condições de estresse hídrico (EST). A terceira barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 sob condições de estresse hídrico (EST) e

sob condições de irrigação normal (CTR). A quarta barra corresponde à expressão relativa dos genes em plantas não-transgênicas sob condições de estresse hídrico (EST) e sob condições de irrigação normal (CTR). O asterisco indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, calculada pelo programa *Rest*. 38

1. INTRODUÇÃO

Estresses abióticos afetam as plantas prejudicando seus processos biológicos e, por consequência, a produtividade de diversas culturas em todo o mundo. Em particular, o déficit hídrico ao qual as plantas são submetidas durante períodos de estiagem e seca mostra-se importante tendo em vista que a água participa, direta ou indiretamente, de praticamente todos os processos fisiológicos que ocorrem na planta, desde a fotólise na fotossíntese até o favorecimento de ligações hidrofóbicas de macromoléculas (Hsiao, 1973), além de influenciar em diversas características morfo-anatômicas. Alterações no metabolismo e na morfologia da planta que ocorrem sob déficit hídrico podem acarretar em perda de produtividade ou até mesmo levá-las à morte.

O estudo de genomas de plantas que são conhecidamente tolerantes à seca pode auxiliar no melhor entendimento da modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na proteção da planta contra os efeitos adversos causados pelo déficit hídrico. Dentro desse contexto, a prospecção de genes pelo estudo do genoma expresso (transcriptoma) em plantas silvestres conhecidamente adaptadas aos diversos estresses ambientais tem possibilitado a identificação de novos genes de resistência/tolerância a estresses em plantas (Bertioli et al., 2011), e sua disponibilização para programas de melhoramento genético.

A efetiva prospecção de genes em genomas que são fonte potencial de novos alelos envolvidos na tolerância à baixa disponibilidade de água no solo está associada à disponibilização do sequenciamento desses genomas, incluindo algumas culturas órfãs como o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*).

A prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico na espécie silvestre *A. duranensis* foi realizada por meio de sequenciamento de 454 de transcritos expressos em resposta ao déficit hídrico durante ensaio do tipo drydown (Guimaraes et al. 2012). *Arachis duranensis* (acesso K7988) é o parental diplóide do amendoim cultivado e apresenta resposta de transpiração conservativa, gradual, quando submetidas a condições limitantes de água no solo (Leal-Bertioli et al. 2012). Dentre os genes candidatos oriundos desses estudos, o gene que codifica uma Dehidrina se destacou em análises *in silico* e por RT-qPCR por apresentar um aumento da sua expressão em raízes de *A. duranensis* em resposta ao estresse hídrico quando comparada ao controle não-estressado.

Dehidrinas (DHN) são proteínas do tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que se acumulam em altas quantidades nas fases finais do processo de desenvolvimento das sementes e em resposta ao déficit hídrico (Ingram e Bartels, 1996), o que sugere sua relação com a proteção da planta quando exposta à desidratação. Nessas condições, as dehidrinas atuam como chaperonas no mecanismo de proteção das células vegetais pela mudança na sua conformação para interagir com outras proteínas e membranas de forma a conservá-las íntegras e manter o metabolismo celular.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos da superexpressão do gene *AdDHN*, que codifica uma Dehidrina do tipo SK₂ isolada de *A. duranensis*, em plantas transgênicas do sistema-modelo *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresses por temperaturas extremas e seca, e avaliar o potencial do *AdDHN* como candidato para conferir tolerância à estresses abióticos em plantas via transgenia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Déficit hídrico e seus efeitos na planta

Um dos recursos mais utilizado e essencial para o metabolismo das plantas é a água, que, portanto, precisa estar sempre em quantidades ótimas e ser aproveitada de forma eficiente pelo vegetal para que o mesmo mantenha suas condições adequadas de crescimento e desenvolvimento (Pimentel, 2004).

A diminuição do turgor das células é a primeira consequência da baixa disponibilidade de água, podendo ser observada a sua interferência em processos que acontecem em nível molecular e celular. Assim, a continuidade dos processos de crescimento vegetal, expansão, divisão celular, e fotossíntese é afetada em condições de déficit hídrico, pois dependem da manutenção do turgor nas células vegetais (Blum, 2011). O comprometimento da expansão e divisão celular tem como consequência a diminuição da área foliar (Cirilo e Andrade, 1994) em relação às plantas em condições de alta disponibilidade de água. Por outro lado, se a planta já tiver atingido o seu grau máximo de maturidade e não puder responder ajustando a sua área foliar, ocorre a abscisão das folhas pelo aumento na produção do fitohormônio etileno. Além disso, a percepção do estresse hídrico desencadeia maior produção de vários outros fitohormônios, com destaque para o ácido abscísico (ABA), que atua como ativador de cascatas de transdução de sinais em situações de estresse (Wilkinson e Davies, 2010).

O aumento do sistema radicular, e uma redução na razão parte aérea/raiz, é também estimulado pelo acúmulo de ABA nas raízes (Munns e Sharp, 1993). O crescimento das raízes permite que as plantas explorem melhor o perfil do solo, se tornando mais profundas e com maiores possibilidades de encontrar água (Goldman et al., 1989).

O controle da abertura estomática faz com que ocorra a queda na transpiração, representando uma resposta em curto prazo ao déficit hídrico. Esta resposta, que também é induzida por ABA, resulta na diminuição da perda de água. Por outro lado, aumenta a resistência à entrada de CO₂, acarretando na queda de fixação de CO₂ por meio da fotossíntese (Lawlor e Cornic, 2002). Dependendo da duração do estresse por déficit hídrico, pode ocorrer a queda na produtividade da cultura e injúrias ao cloroplasto por meio do processo de fotoinibição (Bray, 2001).

Além disso, como forma de regular o potencial osmótico das células sob déficit hídrico, ocorre também o acúmulo de solutos nas células, como açúcares, aminoácidos e outros metabólitos de baixo peso molecular. O acúmulo do aminoácido prolina, por exemplo, chega a participar de mais de 50% do ajuste osmótico em células de raízes primárias de plântulas de

milho (Sharp, 2004), e é um dos aminoácidos mais estudados no que diz respeito à estresse osmótico.

2.2. O amendoim silvestre como fonte de alelos de tolerância à seca

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) pertence à família Fabaceae que tem seu centro de origem na América do Sul, mais especificamente na Serra de Amambai, no limite do Mato Grosso do Sul com o Paraguai, onde ocorre a espécie mais antiga do gênero, *A. guaranítica* (Gregory et al., 1980). A partir daí, ocorreu a dispersão das espécies, que tiveram que se adaptar a condições ambientais adversas, conservando alelos que lhes conferem tolerância ou resistência aos diferentes estresses bióticos e abióticos. As espécies silvestres de *Arachis* spp. apresentam, assim, alta diversidade genética e são uma fonte rica de alelos de resistência a doenças e de adaptação aos estresses ambientais. O amendoim cultivado surgiu como consequência da hibridização de duas espécies silvestres diplóides, *A. duranensis* (doadora do genoma A) e *A. ipaënsis* (doadora do genoma B), seguida da duplicação espontânea dos cromossomos (Seijo et al., 2004; Seijo et al., 2007), o que o caracteriza como alotetraplóide ($2n=4x=40$), possuindo dois conjuntos completos de cromossomos de diferentes genomas (genoma A e B). A tetraploidização fez com que o amendoim cultivado ficasse isolado reprodutivamente de seus parentes silvestres estreitando, assim, sua base genética. Em contrapartida, as espécies diplóides silvestres de *Arachis* spp. que são geneticamente mais diversificadas (Hilu e Stalker, 1995; Moretzsohn et al., 2004; Bravo et al., 2006; Raina et al., 2001; Gimenes et al., 2002; Singh et al., 2002; Tallury et al., 2005; Seijo et al., 2007; Robledo et al., 2009, 2010), tornaram-se fonte potencial de alelos para o melhoramento da espécie cultivada.

Em termos de produção mundial de oleaginosas, o amendoim ocupa o terceiro lugar, ficando atrás apenas da soja e da canola (USDA-FAS, 2016). Sua importância entre as oleaginosas se dá pela sua alta qualidade nutricional, apresentando em sua semente 44 a 56% de óleo e 22 a 30% de proteína, de acordo com a variedade e as condições ambientais (Freire et al., 1999).

O Brasil, mais especificamente a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), abriga o maior Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do mundo de amendoim silvestre, com 1.300 acessos de 79 espécies (Simpson et al., 2001), o que facilita a exploração e valoração desse valioso patrimônio genético. Para caracterizar parte desse BAG em relação à resposta à seca, foi realizado um ensaio de déficit hídrico gradual (*dry-down*; Sinclair e Ludlow, 1986), na qual o regime de reposição de água se baseia na taxa de transpiração diária das plantas, com 10 acessos de espécies diplóides silvestres e seu comportamento comparado ao grupo de duas variedades tetraplóides de amendoim cultivado (Leal-Bertioli et al., 2012). Esse estudo revelou que os diplóides tendem a apresentar uma redução mais gradativa da taxa de transpiração do que os tetraplóides cultivados à medida que a quantidade de água disponível no solo diminui e, em particular, o acesso K7988 de *A. duranensis* mostrou uma resposta de transpiração mais conservativa, ou seja, uma queda mais gradual da transpiração,

e não abrupta. Posteriormente, os genes expressos em plantas de *A. duranensis* (acesso K7988) submetidas a estresse hídrico gradual foram sequenciados pela tecnologia Roche/454 e resultaram em um total de 12.792 unigenes (Guimaraes et al., 2012). A partir da análise *in silico* desses unigenes, 46 genes candidatos envolvidos com a resposta à seca tiveram sua expressão validada por RT-qPCR. Destes estudos, vários genes apresentaram regulação significativa em seu perfil de expressão em resposta ao déficit hídrico, entre eles a *dehidrina*, objeto do presente estudo, que mostrou uma regulação positiva (*upregulation*) 28 e 23 vezes maior que o controle não estressado (Brasileiro et al., 2015). Esse gene que codifica uma Dehidrina de *A. duranensis* foi denominado *AdDHN* e selecionado para estudos moleculares mais aprofundados visando um melhor entendimento de sua estrutura molecular, do seu papel na resposta ao déficit hídrico e do seu potencial como candidato para conferir tolerância à seca em plantas via transgenia.

2.3. Dehidrina

As Dehidrinas fazem parte de um grupo de proteínas do tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que são encontradas em grandes concentrações (acima de 4% das proteínas totais da célula) na fase final da embriogênese e em outros tecidos que estão sofrendo dessecação (Roberts et al., 1993).

A estrutura da molécula de Dehidrina já foi elucidada e possui alta abundância de aminoácidos polares, e há a distinção dos diferentes tipos de Dehidrinas de acordo com os segmentos/domínios de aminoácidos apresentados (Rorat, 2006). O segmento K é o mais conservado, aparecendo em todos os tipos e se destaca por apresentar uma sequência de 15 aminoácidos rica em lisina (EKKGIMDKIKEKLP), podendo variar de 1 a 11 cópias, localizado perto da parte C terminal. Um segundo segmento conservado é o Y, rico em tirosina e localizado perto da região N terminal. E o segmento S, rico em serina, que pode ser fosforilado ou não. Portanto, as combinações de estruturas possíveis dos diferentes tipos de Dehidrina são: Kn, SKn, KnS, YnKn e YnSKn, variando na quantidade e posição dos segmentos (Campbell e Close, 1997).

Estudos têm indicado que a superexpressão de genes que codificam Dehidrinas pode aumentar a tolerância de plantas aos estresses abióticos, em particular seca, frio e salinidade (Hanin et al., 2011). Dehidrinas do tipo SK₂, como a *AdDHN*, aumentam a tolerância ao frio por meio de ligações com membranas celulares (Danyluk, 1998 e Houde, 2004), e redução da peroxidação de lipídeos (Hara, 2005). Alguns desses efeitos também são mostrados nos trabalhos de Kovacs (2008) e Wang (2013), onde a *dehidrina* do tipo SK₂ foi superexpressa em plantas de *Arabidopsis thaliana* conferindo-lhes a capacidade de tolerar a deficiência hídrica.

Svensson (2002) explica que sob condição de escassez de água, o segmento K da Dehidrina sofre uma mudança na sua conformação, mantendo uma configuração do tipo α -hélice. Essa configuração permite que os poucos aminoácidos hidrofóbicos existentes na molécula fiquem mais próximos e sua área de interação seja maximizada (Roberts et al., 1993), o que torna essa região anfipática. A conformação das proteínas geralmente está relacionada

com sua função. Por esse motivo, moléculas de Dehidrina são comparadas com as de apolipoproteínas e α -sinucleínas, que também possuem estrutura que lhe proporciona o caráter anfipático, indicando o possível papel das Dehidrinas nas interações hidrofóbicas com membranas e proteínas desnaturadas (Rorat, 2006).

Assim, as propriedades das Dehidrinas indicam que ela está relacionada com a proteção de biomoléculas que podem vir a sofrer danos com a desidratação das células. Suas funções não estão totalmente compreendidas, mas há muitos indícios de que as Dehidrinas possam interagir com outras proteínas para evitar sua desnaturação e/ou oxidação, e atuar na “limpeza” dos radicais livres produzidos pelas células em estresse oxidativo, impedindo que esses radicais reajam com moléculas essenciais ao metabolismo celular (França et al., 2007).

Em ensaios feitos com plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *DHN5*, que codifica uma proteína chamada DHN5 pertencente ao grupo 2 de proteínas LEA, submetidas a estresse hídrico e salino foi possível concluir que as plantas transformadas exibiram maior taxa de retenção de água como também toleraram visivelmente aos estresses, não apresentando folhas senescentes, como foi observado nas plantas não transformadas também submetidas aos estresses (Brini et al., 2007). Figueras et al. (2004) também reportou uma maior tolerância ao estresse osmótico em *A. thaliana* superexpressando dehidrina (*RAB17*) vinda do milho, onde teores de açúcares e água foram analisados e a fenologia das plantas, transformadas e não-transformadas, submetidas ao estresse osmótico foi comparada. Esses estudos contribuem para relacionar as dehidrinas também com o ajuste osmótico das células, mantendo o potencial hídrico das mesmas.

Durante o estresse vários genes são ativados e há a interação de outras proteínas com a Dehidrina (Cramer et al., 2011). A ascorbato peroxidase, galactinol sintase e DREB são algumas das proteínas modificam sua expressão quando se analisa essas interações, e todas elas têm o papel de responder positivamente aos diversos estresses abióticos.

2.4. ascorbato peroxidase, galactinol sintase e DREB

A ascorbato peroxidase (APx) é uma enzima que atua principalmente na detoxificação de radicais livre nas plantas, catalisando a reação de peróxido de hidrogênio em água, utilizando ascorbato como substrato (Chiang et al., 2015). O processo de detoxificação do peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima ascorbato peroxidase é acompanhado por uma série de reações que, em conjunto, formam uma das vias antioxidantes mais importantes presentes nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa. Nas plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa é particularmente importante nos cloroplastos, visto que estes são as principais fontes produtoras de peróxido de hidrogênio (Jiménez et al., 1997). Alguns trabalhos já mostraram que quando genes que codificam a APx são superexpressos em plantas, há o aumento da tolerância a estresses abióticos. Por exemplo, Chiang et al. (2015) superexpressaram um gene que codifica um tipo de APx vinda de *Brassica campestris* em planta modelo *Arabidopsis thaliana* e as

plantas transgênicas mostraram maior conteúdo de clorofila e maior taxa de sobrevivência quando submetidas ao estresse por calor e comparadas às plantas não transformadas.

A galactinol sintase (GolS) é uma enzima que catalisa a reação de síntese de rafinose, que é um oligossacarídeo com função osmoprotetora (Nishizawa et al., 2008). Essa enzima representa uma classe relativamente pequena da família das glicosil transferases (Sengupta et al., 2012). A enzima GolS é encontrada apenas em angiospermas, o que torna a síntese de galactinol um evento metabólico altamente especializado em plantas vasculares. A síntese de galactinol é produzida em condições normais nas angiospermas, porém, em pequenas quantidades, mas, sob condições específicas, tais como durante a maturação associada à dessecação das sementes, na sinalização planta-patógeno, em danos causados por estresse bióticos e na resposta a diversos estresses abióticos, há o aumento da síntese de rafinose nessas plantas (Amiard, 2003; Cho et al., 2010; Fowler, 2002; Haritatos, 2000; Panikulangara, 2004; Peterbauer e Richter, 2001; Sengupta e Majumder, 2015).

DREB são proteínas regulatórias envolvidas na transdução de sinais e na expressão gênica em resposta a diferentes estresses abióticos, incluindo deficiência hídrica (Lata e Prasad, 2011). Os fatores de transcrição interagem com regiões específicas dos promotores de genes responsivos a diversos estresses, controlando a resposta das plantas em situações de estresse, regulando a expressão desses genes (Nakashima et al. 2009; Lindemose et al. 2013). Genes *DREB* isolados de várias culturas, como soja, arroz e milho já foram isolados e superexpressos em outras plantas e foi verificado o aumento da tolerância à salinidade, ao déficit hídrico, ao frio e ao calor (Jin et al, 2010; Gutha e Reddy, 2008; Qin et al., 2007).

2.5. Arabidopsis como planta-modelo para transformação genética

Atualmente, uma das plantas mais utilizadas como modelo para estudos genéticos e moleculares é a *Arabidopsis thaliana*. Dentre as principais características que tornam *A. thaliana* um sistema-modelo, está o ciclo de vida muito curto quando comparado às outras plantas vasculares. O período que compreende a germinação, desenvolvimento, floração, maturação e formação de sementes dura somente cerca de seis semanas. Em vinte dias já é possível ver os botões florais, em trinta dias vê-se as inflorescências e, em quarenta e cinco dias as sementes já são formadas e a planta começa a senescer (Boyes et al., 2001). Além disso, *A. thaliana* possui pequeno porte e se reproduz de forma autógama, o que permite maior facilidade para acessar e estudar alelos recessivos. E em cada florada a produção de sementes fica em torno de 5.000 por planta (Meinke et al., 1998). Outra importante característica de *A. thaliana* é o seu reduzido genoma, sendo cerca de quatro vezes menor que o do arroz e 130 vezes menor que o do trigo, por exemplo (Devos et al., 2000). Cerca de 80% de seu genoma é composto por sequências codificantes, enquanto em trigo, por exemplo, esse número cai para apenas 1%, o que facilita o sequenciamento, isolamento e o entendimento das funções dos genes existentes (Delatorre e Silva, 2008). Outra característica importante é que *Arabidopsis* já possui um sistema de transformação genética estabelecido, tornando possível avaliar, de uma maneira simples e rápida, os efeitos pleiotrópicos da superexpressão, ou do

silenciamento, de genes-candidatos no sistema de regulação gênica eucariota vegetal. Por exemplo, alguns genes podem ser letais quando expressos constitutivamente ou silenciados, além dos efeitos já bastantes conhecidos de co-supressão e co-regulação de transgenes (Ricroch et al., 2011). Por isso, a avaliação de um gene-candidato deve ser feita em um sistema modelo mais simples e de fácil análise, como *A. thaliana*, antes da sua introdução na planta-alvo, geralmente um processo mais complexo, oneroso, longo e laborioso.

Por esses motivos, *A. thaliana* foi escolhida como sistema-modelo para estudar os efeitos pleiotrópicos da superexpressão do *AdDHN* e, em particular, durante o déficit hídrico.

3. JUSTIFICATIVA

Uma das maiores exigências de todas as culturas e maior entrave para a produtividade das mesmas é a disponibilidade de água. Muitas técnicas de manejo do ambiente ou da própria planta são utilizadas para que o uso da água seja mais eficaz, por isso a genética e a biotecnologia são ferramentas essenciais na procura para obter cultivares mais tolerantes a escassez de água. A prospecção de genes é feita com frequência para encontrar sequências responsivas a seca nas diversas culturas de interesse econômico, e a dehidrina apresentou alta expressão gênica em raízes de plantas silvestres de amendoim (*A. duranensis*) submetidas ao déficit hídrico. Com isso, espera-se validar esse gene como um dos genes que aumenta a tolerância ao déficit hídrico por meio da sua superexpressão em planta-modelo (*Arabidopsis thaliana*), fazendo a caracterização molecular e fisiológica dessas plantas.

4. HIPÓTESES

- 1) A superexpressão do gene *AdDHN* de *A. duranensis* aumentará a tolerância de *Arabidopsis thaliana* ao déficit hídrico;
- 2) A superexpressão do gene *AdDHN* de *A. duranensis* resultará em mudança no ajuste osmótico em *A. thaliana*.
- 3) A superexpressão do gene *AdDHN* de *A. duranensis* afetará a expressão de outros genes relacionados ao estresse hídrico;

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

Estudar os efeitos da superexpressão do gene *AdDHN*, que codifica uma Dehidrina do tipo SK2 isolada de *A. duranensis*, em plantas transgênicas do sistema-modelo *Arabidopsis thaliana* submetidas a diferentes estresses.

5.2. Específicos

- 1) Introduzir o vetor binário pPZP contendo *AdDHN* em *Agrobacterium tumefaciens* e transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*;
- 2) Selecionar linhagens transgênicas na geração T2 em homozigose e realizar sua caracterização molecular;
- 3) Avaliar o comportamento das linhagens selecionadas na resposta a NaCl e manitol;
- 4) Avaliar o comportamento das linhagens selecionadas no ajuste osmótico em situação de déficit hídrico.
- 5) Avaliar a expressão dos genes ascorbato peroxidase, galactinol sintase e *DREB* nas linhagens selecionadas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Interação Planta-Praga III (LPP-III), no Prédio de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), e no Laboratório de Bioquímica Vegetal, no Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro. Ambos localizados em Brasília-DF, Brasil.

6.2. Caracterização do *AdDHN*

A identificação e caracterização *in silico* da sequência completa do cDNA do gene *AdDHN* foi realizada a partir do banco de dados de transcrito de *Arachis* spp. da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://lbi.cenargen.embrapa.br/arachis/node/1>) que contém um total de 144.597 unigenes gerados em diferentes projetos de genômica funcional da equipe. Dados de sequências de *Arachis* spp. disponíveis em banco de dados públicos [*National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Phytozome*] foram também utilizados nessa caracterização. A mineração dos dados disponíveis (*data mining*) foi realizada para a determinação, na *AdDHN*, dos domínios conservados de Dehidrinas já descritas. Dados de sequências genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* (ainda em domínio restrito) foram também utilizados para a caracterização da sequência codante do *AdDHN* e para descrever seu modelo gênico (*gene model*). A sequência putativa do cDNA do gene *AdDHN* identificada e caracterizada *in silico* foi, então, confirmada pelo sequenciamento do produto de amplificação do cDNA de *A. duranensis* pela técnica de PCR, utilizando iniciadores (*primers*) desenhados dentro da sequência putativa, como descrito previamente (Morgante et al., 2011).

6.3. Clonagem do *AdDHN* no vetor binário pPZP

Uma vez determinada a sequência do cDNA do gene *AdDHN*, o mesmo foi sintetizado e clonado no vetor binário pPZP-201BK-EGFP (ou simplesmente pPZP; Figura 1) (Chu et al., 2014) utilizando-se serviços de síntese de genes (Epoch Life Science). Para superexpressão, o gene *AdDHN* foi clonado no sítio de restrição Xho I no vetor pPZP (Covert et al., 2001), o cDNA do gene candidato está sob controle do promotor constitutivo da Actina 2 (ACT-2) e do terminador da Nopalina Sintase (NOS), ambos de *A. thaliana* (Yang et al., 2003). Outro cassete contém o gene repórter *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) dirigido pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e com terminador de Nopalina Sintase (NOS) (Novak et al., 2000) e um gene marcador de seleção (resistência à higromicina) dirigido pelo promotor de Ubiquitina (UBI3) de *A. thaliana* e também com o terminador de Nopalina Sintase (NOS).

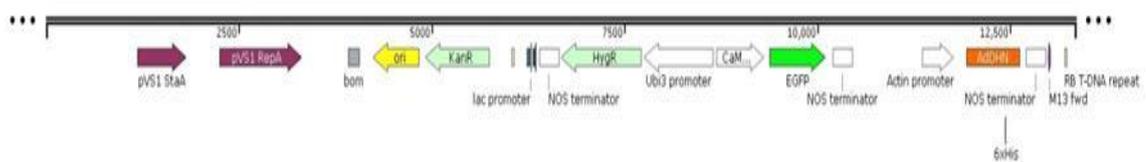


Figura 1. Mapa do vetor pPZP-AdDHN.

6.4. Transformação de *A. tumefaciens* com o vetor binário pPZP-AdDHN

Após síntese e clonagem, o vetor binário pPZP contendo o cassete com o gene *AdDHN* clonado (a partir de agora denominado pPZP-*AdDHN*) foi transferido para a linhagem desarmada GV 3101 de *A. tumefaciens* pelo método do choque térmico, conforme protocolo padrão (Brasileiro e Carneiro, 2013). Em resumo, foi colocado 1 μ L de DNA plasmidial 10 pg em tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL contendo aproximadamente 40 μ L de suspensão com *A. tumefaciens* em glicerol a 10% (v/v), e incubado no gelo por cerca de dois minutos. A suspensão foi transferida para a cubeta resfriada a 4°C e eletroporada utilizando 2,2 kV no eletroporador MicroPulser – (BioRad). Imediatamente após o pulso, 1 mL de meio LB líquido foi colocado na cubeta e misturado à suspensão, com o auxílio da pipeta. Novamente essa suspensão foi transferida para um tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL e foi incubada a 28°C, durante duas horas. Depois, foram distribuídos e plaqueados diferentes volumes (50, 100 e 200 μ L) em placas com meio LB sólido contendo canamicina (100 mg/mL) e gentamicina (50 mg/mL), e incubadas por dois dias, a 28°C, para que crescessem as colônias da bactéria. Colônias isoladas foram selecionadas para fazer PCR das regiões encontradas no PZP-*AdDHN* e na bactéria: eGFP, Virulencia, resistência à Higromicina (Novak et al., 2000; Covert et al., 2001; Yang et al., 2003) e da ORF do *AdDHN*. Após confirmação por PCR, a colônia positiva foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido contendo canamicina (100 mg/mL) e gentamicina (50 mg/mL), por 16 horas, a 28°C. Uma alíquota desse meio de cultura foi armazenada em glicerol 15% em freezer -80°C para uso posterior.

6.5. Transformação e seleção de gerações T1 e T2 de linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *A. thaliana* (ecotipo Columbia; Col-0) foram desinfetadas utilizando etanol 70%, contendo 0,1% de Triton® X-100, em agitação lenta durante 1 minuto e plantadas, com o auxílio de palitos estéreis, em 6 potes plásticos de 10x5cm com substrato esterilizado por autoclavagem, totalizando 10 sementes por pote. Os potes ficaram no escuro durante dois dias a 4°C, para que a germinação de todas as sementes fosse uniforme, e depois transferidos para condições controladas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 21°C, com irrigação três vezes por semana. Transcorrido um mês do plantio, foi feita a poda dos botões florais. No dia da transformação, foram retiradas todas as sílicas já formadas e as flores abertas, para que houvesse certeza dos prováveis botões transformados.

A transformação de *A. thaliana* foi realizada pelo método de imersão dos botões florais (*floral dip*; Clough e Bent, 1999), que acontece em três etapas. Primeiro foi realizado o pré-inóculo, onde estoques em glicerol de *A. tumefaciens* transformadas contendo o vetor binário pPZP-*AdDHN* cresceram em 3 mL de meio LB líquido com canamicina (100 mg/L) e gentamicina (50 mg/L), por 12 horas a 28°C e em rotação de 180rpm. Em uma segunda etapa, o pré-inóculo foi transferido para 250 mL de meio LB líquido com canamicina (100 mg/L) e gentamicina (50 mg/L), e cultivado por 12 horas a 28°C.

A absorbância da suspensão bacteriana a 600 nm (A_{600}) foi então determinada pela leitura em espectrofotômetro e estava em fase exponencial de crescimento, i. e., A_{600} entre 0,6 e 0,8. A suspensão foi dividida em tubos do tipo Falcon de 50 mL e centrifugada a 9484 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo é invertido para eliminar traços de meio. O precipitado foi ressuspensionado em 250 mL de solução de sacarose 5% (p/v) com agregante superficial Silvet 0,05% (v/v). Os botões florais ainda fechados de *A. thaliana* foram então imersos nesta solução contida em um pote de plástico. As plantas foram mantidas em caixa de plástico fechada por uma semana quando a imersão dos botões florais em solução de *A. tumefaciens* foi então repetida para que os botões florais que vierem depois do primeiro *floral dip* também fossem transformados.

As plantas transformadas foram mantidas em condições controladas de sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 21°C, com irrigação duas vezes por semana, até as sílicas começarem a secar, quando a irrigação foi suspensa. As sílicas foram coletadas somente quando estavam completamente secas e visivelmente maduras. As sementes foram então semeadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) contendo higromicina (50 mg/L), que é o antibiótico de seleção conferido pela presença do gene *HygroR* no T-DNA do vetor pPZP-*AdDHN* (Figura 1). As plântulas que germinaram e sobreviveram neste meio seletivo foram analisadas em lupa quanto à emissão fluorescência da GFP (coloração verde-fluorescente) quando expostas ao comprimento de onda de luz próximo ao da luz ultra-violeta. A GFP é codificada pelo gene repórter *eGFP*, também contido no T-DNA do vetor pPZP-*AdDHN* (Figura 1) e serve como controle positivo para a transformação. As plântulas germinadas (geração T0) em meio seletivo e expressando *eGFP* foram transferidas para sala

de cultivo de plantas, mantidas em substrato e irrigadas a cada dois dias até a floração e secagem das sílicas.

As sementes (geração T1) oriundas de cada planta T0 potencialmente transgênica foram coletadas e estocadas a 4°C devidamente identificadas. Para a seleção das linhagens transgênicas em T1, as sementes T1 foram semeadas em meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962) contendo higromicina (50 mg/L) e avaliadas quanto à segregação da resistência ao antibiótico (taxa de segregação 3:1 esperada). Cada plântula T1 selecionada foi enumerada como uma linhagem diferente. Seguindo o mesmo protocolo, linhagens transgênicas T2 foram também obtidas a partir de cada linhagem T1 selecionada e avaliadas quanto à segregação em relação a resistência ao antibiótico para selecionar plantas homocigotas contendo o transgene *AdDHN* (Figura 2).

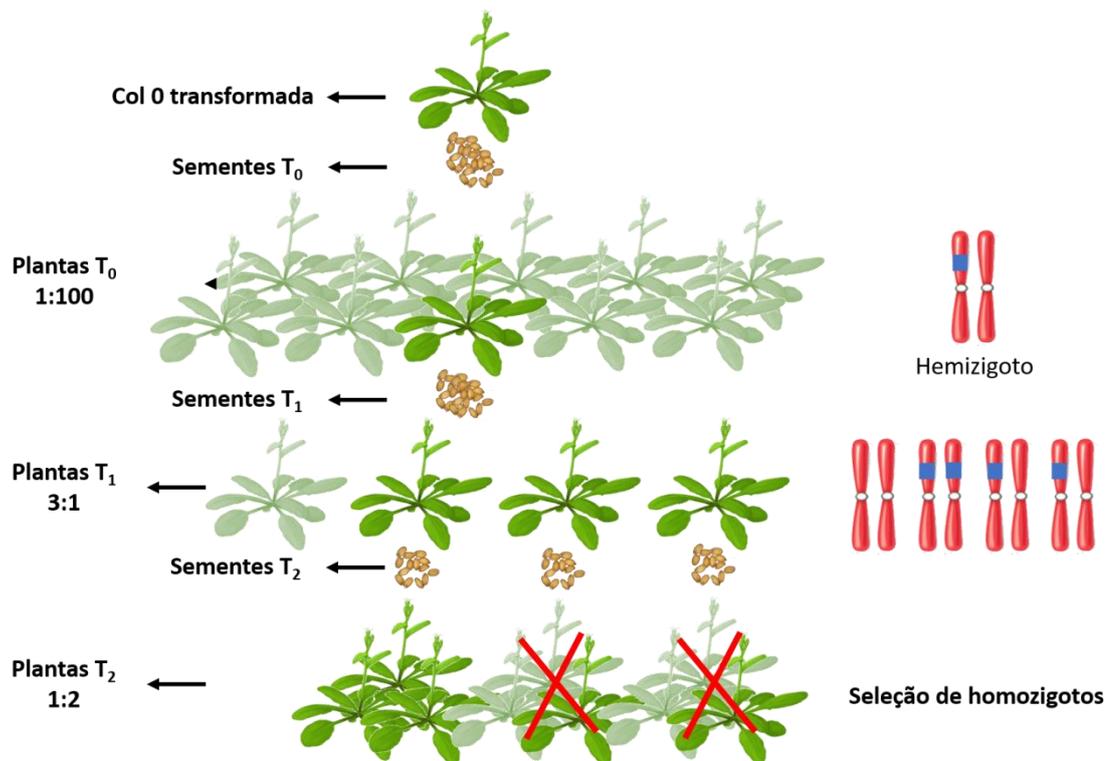


Figura 2. Imagem ilustrativa da segregação de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*.

Os testes de segregação foram feitos com todos os eventos de transformação na geração T2 para identificar as linhagens em homocigose. Este teste consiste em germinar as sementes em placas de meio MS com higromicina (50 mg/L), se todas as sementes de uma planta germinarem e se desenvolverem normalmente, esta planta é considerada homocigota e suas sementes também (Figura 3).

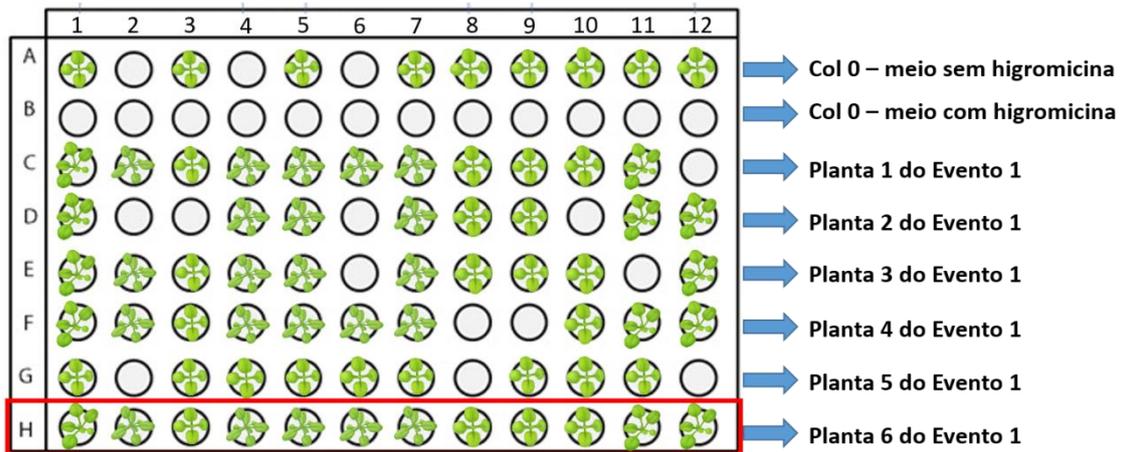


Figura 3. Teste de homozigose em plantas na geração T2 em placas de meio MS com higromicina. Na primeira fileira um controle positivo de plantas de *Arabidopsis* não-transformadas em Meio MS sem higromicina, na segunda fileira o controle negativo com plantas não-transformadas em meio MS em meio MS com higromicina e nas fileiras restantes sementes T2 de seis diferentes eventos.

6.6. Caracterização molecular de linhagens transgênicas T1 de *A. thaliana*

O RNA total foi extraído de plantas das linhagens transgênicas utilizando kit de extração de RNA de plantas (Qiagen).

A análise quantitativa foi feita a 260 nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific). Já a análise qualitativa foi feita utilizando eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídio, com tampão de corrida TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1% e voltagem de 90 V, por aproximadamente 30 minutos.

O RNA extraído de plantas das linhagens transgênicas foi submetido à análise pela técnica de RT-qPCR com objetivo de quantificar as expressões relativas dos transgenes, de acordo com o protocolo descrito por (Morgante et al. 2013). Os primers usados para amplificação de *AdDHN* foram *forward* (5' ATGGCAGAGGAGCACCAC 3') e *reverse* (5' TCGCCACCGAGTTTGACGACAA 3') e para o gene referência que codifica actina foram *forward* (5' CTTGCACCAAGCAGCATGAA 3') e *reverse* (5' CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT 3').

Os dados obtidos pela técnica de RT-qPCR foram corrigidos no software *Miner* (<http://www.miner.ewindup.info/>), que calcula a eficiência de cada reação de PCR fornecendo os valores de C_T (*Cycle threshold*), que é o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial. Os C_T s do gene alvo foram normalizados com os valores de C_T s do gene referência. Após isso, o software *Qgene* foi usado para calcular a expressão relativa de cada linhagem transgênica, onde os valores dos C_T s do gene alvo e do gene referência são inseridos e o programa calcula a expressão realtiva basal de cada linhagem, subtraindo os valores da média dos C_T s das triplicatas técnicas do gene alvo da média dos C_T s do gene referência.

6.7. Análise de expressão de genes relacionados à desidrina

A análise da interação de outras proteínas com a Dehidrina foi feita utilizando o *software on-line* String (<http://string-db.org/>). Após traduzir os nucleotídeos em aminoácidos no *site* Expsy (<http://web.expasy.org/translate/>), a sequência peptídica deduzida de *AdDHN* foi colocada no *String*, e foi gerada uma rede de interação da proteína AdDHN com outras proteínas do organismo selecionado (*A. thaliana*). Dentre essas proteínas, estavam a Ascorbato Peroxidase, a Galactinol Sintase e o fator de transcrição DREB. *Primers* foram desenhados pelo *Primer3Plus* e foram feitas RT-qPCR com o evento selecionado e a planta não-transformada, sob condições controladas, sob estresse de seca e após reidratação.

Os iniciadores utilizados para a amplificação do ascorbato peroxidase foram *forward* (5' GCATGGACATCAAACCCTCT 3') e *reverse* (5' TTTCTGAGCTTGGGTTTGCT 3'), para a amplificação do galactinol sintase foram *forward* (5' GGCTATTTGTACGCGGTGAT 3') e *reverse* (5' GACTCCTTTCGCTGAACAGG 3') e para a amplificação de *DREB* foram *forward* (5' AAGGGTCGAAGAAGGGTTGT 3') e *reverse* (5' ATGTATGGTCCTTTGGCTCG 3') (Kubo et al. 1992 e Ribeiro et al., 2014)

6.8. Ensaio de frio e calor

Todas as linhagens selecionadas em homocigose seguiram para os ensaios de frio e calor. Para esses ensaios foram utilizadas placas de Petri de 150x15 mm com meio MS (Murashige e Skoog 1962), divididas em 6 partes iguais. Em cada placa foram plantados 5 linhagens e a Col 0 não-transformada (12 sementes de cada linhagem e Col 0 não-transformada). Foram feitas triplicatas para cada ensaio com seus respectivos controles (Figura 3).

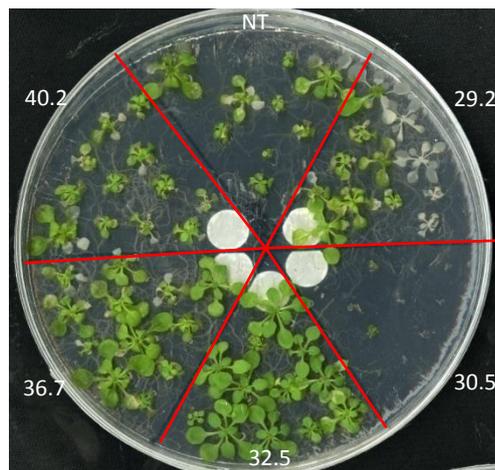


Figura 4. Placa de 150x15 mm com meio MS contendo 12 sementes de cada linhagem (ex. L 29.2, L 30.5, L 32.5, L 36.7 e L 40.2) e da planta não-transformada, após uma hora de tratamento a -18°C.

Os ensaios de frio e calor foram feitos duas semanas após a germinação das sementes. Para o tratamento de frio as placas foram deixadas a -18°C por 1 hora, e o de calor foi feito a 37°C durante 8 horas. Ambos foram analisados a partir de 3 dias após o estresse, quando foi avaliado o número de sobreviventes e as plântulas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores.

Nos ensaios de estresse osmótico, as sementes já foram plantadas em meio contendo NaCl e manitol, separadamente. As concentrações de NaCl e manitol utilizadas foram de 150 mM e 400 mM, respectivamente.

6.9. Ensaio de déficit hídrico

Para o ensaio com seca foram selecionados 4 eventos transgênicos que foram escolhidos baseando-se em ensaios preliminares. Plantas transgênicas em T3 e Col 0 foram semeadas em potes de 250 mL contendo a mesma quantidade de substrato (Tropstrato HT Hortaliças) em cada um deles. Cada pote foi coberto por sacos plásticos, mantidos a 4°C por dois dias e transferidos para câmara de crescimento, onde os sacos foram retirados ao longo dos dias. O ensaio começou quando as plantas tinham três semanas e foram divididas em dois tratamentos, um grupo controle com irrigação a cada dois dias e o grupo estressado, onde a irrigação foi suspensa. No 15º dia após a suspensão da irrigação, os dois grupos foram analisados quanto à sua resposta fenotípica ao déficit hídrico e foram coletadas 10 plantas do grupo estressado e 10 plantas controle. Dessas plantas foram retirados os discos foliares para obter o teor relativo de água de cada uma delas e logo em seguida foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80°C para análises futuras. No mesmo dia um outro grupo de plantas foi reidratado, esperou-se 2 dias e outra coleta foi feita da mesma forma da anterior. Foram tiradas fotos antes da suspensão da rega, com uma semana de seca, com 15 dias de seca e 1 dia após a reidratação (Figura 5).



Figura 5. Imagem ilustrativa do desenho experimental do ensaio de seca.

6.10. Análise da área foliar

Para avaliar a área foliar foram tiradas fotos com câmera digital da parte aérea das plantas tanto transformadas quanto das não transformadas, que foram analisadas pelo *software Rosette Tracker* (De Vylder, 2012).

6.11. Conteúdo relativo de água nas folhas

Para a determinação do teor relativo de água (TRA), foi utilizado o método da submersão de discos foliares, conforme descrito por Klar (1988). Onde, para cada tratamento, 3 discos foliares de 0,8 cm² foram coletados (Clausen & Kozlowski, 1965), e logo em seguida pesados, para a obtenção da massa fresca (MF). Esses mesmos discos foram colocados em placa de Petri contendo água destilada e deixados submersos durante 12 horas. Após esse período, o excesso de água foi retirado, passando rapidamente os discos em papel absorvente e os discos foram novamente pesados, para obter-se a massa túrgida (MT). E para a obtenção da massa seca (MS), os discos seguiram para uma estufa de ventilação (70°C) por 4 horas. Para calcular o conteúdo relativo de água nas folhas, a seguinte equação foi usada: TRA (%) =

$$\frac{MF-MS}{MT-MS} * 100$$

6.12. Quantificação de açúcares solúveis totais (AST)

Primeiro houve a preparação do material, que foi liofilizado por 48 horas, pesou-se 10 mg em *Eppendorf* de 2 mL devidamente identificados. Para a extração adicionaram-se 500 µL de etanol 80%, homogeneizou-se a mistura em vórtex, as amostras foram incubadas no banho-maria a 80°C por 20 minutos e, após centrifugação (10 minutos, 10000g) o sobrenadante foi coletado. Esse processo foi repetido duas vezes e os extratos juntados.

Para a quantificação de açúcares solúveis totais (AST) 50 µL de amostra foram transferidos para um tubo de ensaio. Foram acrescentados 450 µL água milli-Q, 500 µL de fenol 5% e 2500 µL de ácido sulfúrico. Cada amostra foi colocada separadamente em cuvetas e foram feitas as leituras de absorbância a 490 nm (DuBois et al., 1956). A quantificação foi feita por meio de uma curva de calibração utilizando glicose como padrão.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterização do gene desidrina do *Arachis duranensis*

Os resultados da análise *in silico* indicam que a ORF de *AdDHN* possui 676pb, e sua sequência peptídica deduzida possui 225 aminoácidos. A proteína *AdDHN* apresenta um domínio S e dois domínios K (Figura 3). Sendo, portanto, uma Dehidrina do tipo SK_n, mais especificamente SK₂.

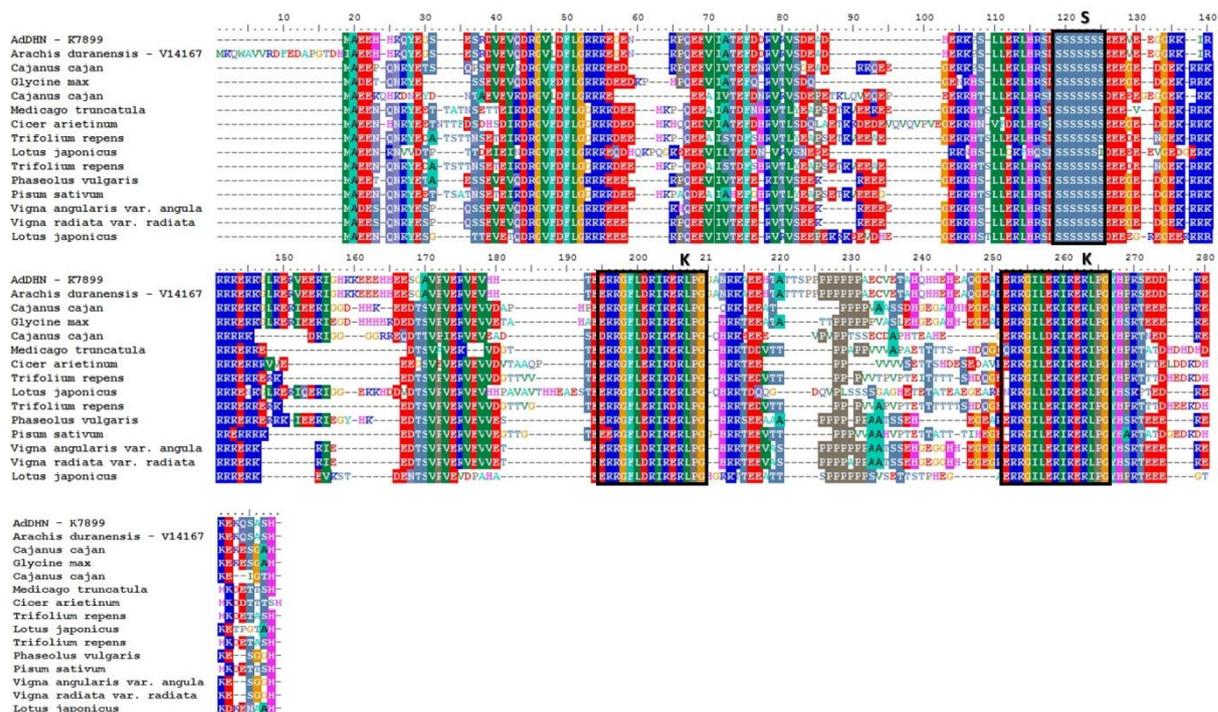


Figura 6. Alinhamento da sequência peptídica deduzida do gene *AdDHN* por meio da ferramenta ClustalW acessado pelo programa BioEdit entre a Dehidrina de *Arachis duranensis* e Dehidrinas de outras leguminosas. Em destaque, os domínios conservados (S = SSSSSSS, K₁ = EKKGFLDKIKEKLPG e K₂ = EKKGILEKIKEKLPG) representando uma Dehidrina do tipo SK2.

7.2. Transformação do vetor binário em linhagem desarmada *A. tumefaciens* GV 3101

O vetor binário pZP-*AdDHN* foi introduzido na linhagem desarmada *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 por meio de eletroporação. A efetividade da transformação foi confirmada por meio de uma análise dos produtos de amplificação obtidos pela PCR das ORF's dos genes *eGFP*, de virulência (*VIRD2A*), que confere resistência à higromicina (*HygroR*) e *AdDHN* (*DHN*) utilizando como *template* o DNA de seis colônias crescidas em meio seletivo (canamicina a 100 mg/mL e gentamicina a 50 mg/mL) (Figura 4) selecionadas aleatoriamente. Os iniciadores utilizados para amplificar *VIRD2A* foram *forward* (5' ATGCCCGATCGAGCTCAAGT 3') e *reverse* (5' CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA 3') (Haas et al, 1995), para *HygroR* foram *forward* (5' TCCGGAAGTGCTTGACATTG 3') e *reverse* (5' ATGTTGGCGACCTCGTATTG 3') (Lacorte et al, 2015) e para amplificar *AdDHN* foram *forward* (5' ATGGCAGAGGAGCACCAC 3') e *reverse* (5' TCGCCACCGAGTTTGACGACAA 3').

A introdução do vetor pZP-*AdDHN* na linhagem GV 3101 foi confirmada pela presença dos genes *eGFP*, *VIRD2A*, *HygroR* e *AdDHN*. As seis culturas bacterianas das colônias selecionadas foram armazenadas em glicerol 15% a -80°C e utilizadas posteriormente para a transformação de *A. thaliana*.

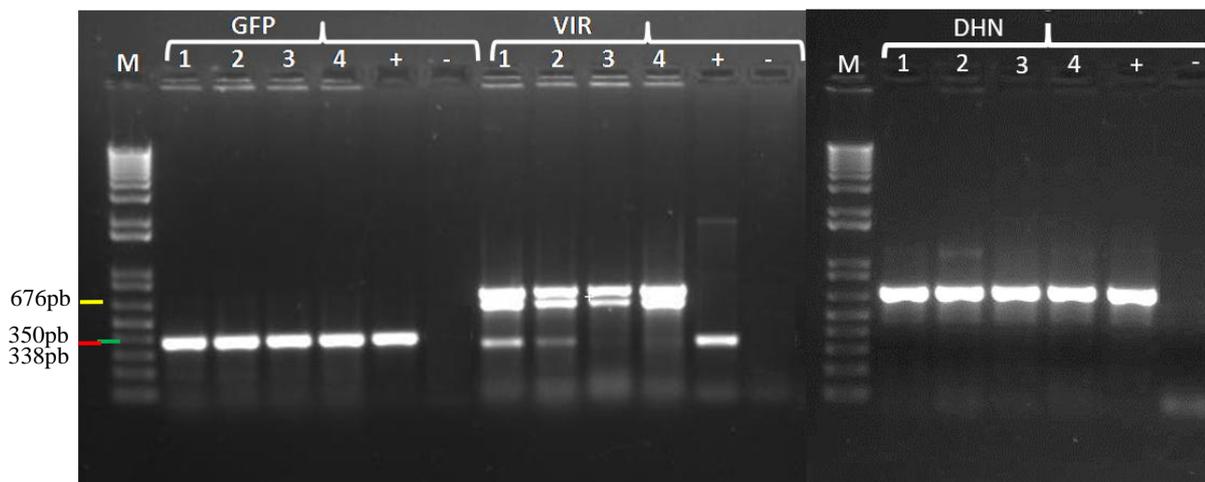


Figura 7. Gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio, contendo produtos de amplificação por PCR de eGFP (350pb, verde), VIR (338pb, vermelho) e AdDHN (676pb, amarelo). Cada par de iniciador foi utilizado para a amplificação por PCR a partir do DNA de cada colônia selecionada. Marcador molecular 1Kb Plus (Invitrogen).

7.3. Transformação de *A. thaliana* e seleção das gerações T0 até T2

A transformação de plantas de *A. thaliana* pelo método de imersão de botões florais com a linhagem de *A. tumefaciens* 4404 contendo o vetor binário pZP-*AdDHN* foi realizada com sucesso. 30 plantas de *A. thaliana* foram transformadas e todas as sementes T0 contidas nas sílicas originárias dos botões florais transformados foram coletadas 20 dias após a transformação. Parte das sementes T0 coletadas foram semeadas em 30 placas de 10x13 mm (meio MS acrescido de 50 mg/L de higromicina), contendo aproximadamente 160 sementes por placa. Depois de duas semanas, 60 sementes T0 germinaram em meio seletivo, correspondendo cada uma a um evento único de transformação. A média de eficiência de transformação foi de 1,25%, correspondendo a 60 sementes T0 selecionadas em meio seletivo a partir de 4800 sementes semeadas. Essa eficiência está acima da média esperada, de 1% para o método de imersão dos botões florais (Clough e Bent, 1999). As sementes (geração T1) oriundas dos eventos de transformação T0 foram semeadas em meio MS seletivo (50 mg/L de higromicina) a uma média de 160 sementes por evento T0. As sementes da geração T1 foram avaliadas quanto à segregação em relação à resistência ao antibiótico, mostrando a taxa de segregação de 0,025 a 0,075%, que é abaixo da esperada de 0,75% de plantas resistentes para cada 0,25% plantas não resistentes ao antibiótico. Todas as 123 plantas selecionadas dos 28 eventos que foram para T1 seguiram para T2 e foram avaliadas quanto à segregação em relação à resistência ao antibiótico, de onde foram selecionadas as plantas homocigotas de cada evento contendo o transgene *AdDHN* (Figura 8 e Apêndice 1).



Figura 8. Resumo ilustrativo das etapas de seleção da geração T0 até T2.

7.4. Seleção de linhagens T2 em homozigose

Sementes na geração T2, derivadas de uma mesma planta em geração T1, foram semeadas em placas com meio seletivo para que fossem selecionadas plantas em homozigose na geração T2 para cada evento. Além da seleção em higromicina, visualização da fluorescência da GFP (Figuras 9 e 10) também foi utilizada para confirmar a expressão do transgene nas plantas. No total, 21 plantas na geração T2 de 13 linhagens distintas foram identificadas como homozigotas, ou seja, não segregaram (Figura 9). Para nove linhagens não foram selecionadas plantas em homozigose. Em média, 21 plantas em geração T2 foram selecionadas como sendo homozigotas para cada 69 sementes semeadas, derivadas de uma mesma planta em geração T1.

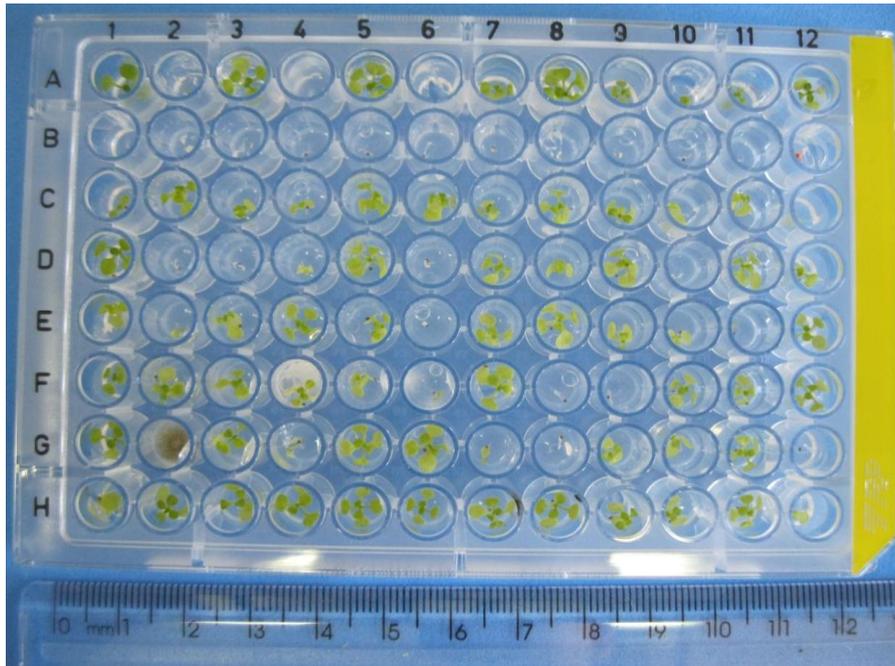


Figura 9. Placa de ELISA contendo meio MS, onde foram semeadas sementes de *A. thaliana* para seleção de plantas em homocigose. Linha A: sementes com Col 0 não transformadas semeadas em meio MS sem higromicina (controle positivo); Linha B: sementes de Col 0 não transformadas semeadas em meio MS com higromicina (controle negativo); Linhas C a H: sementes em geração T2 derivadas de seis plantas T1 semeadas em meio MS com higromicina. Todas as sementes na linha H germinaram e se desenvolveram, indicando que estas plantas são homocigotas, isto é, não segregaram para a resistência à higromicina.

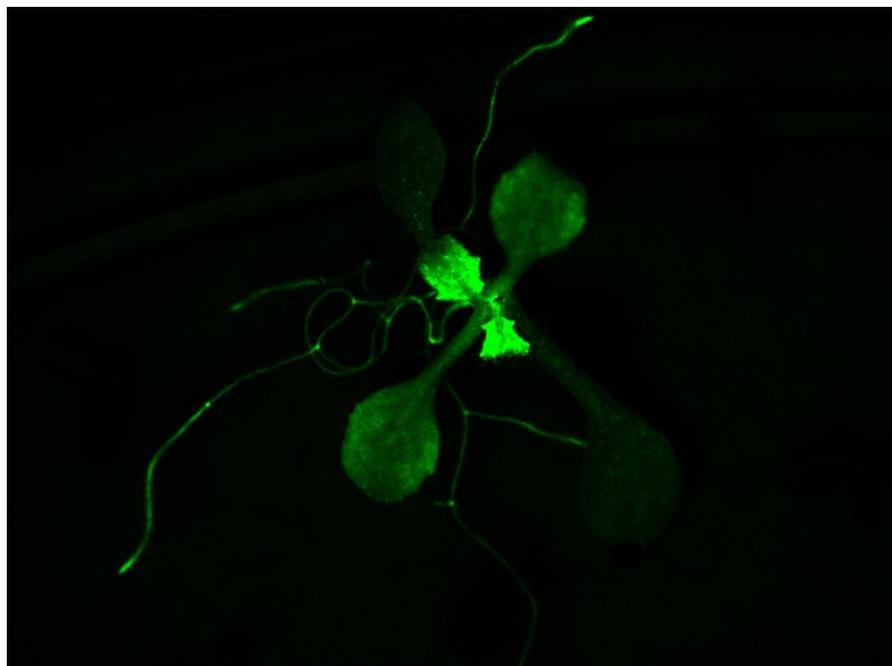


Figura 10. Planta transgênica (linhagem 11.3) em geração T2 emitindo fluorescência quando exposta ao comprimento de onda próximo ao do UV, devido à expressão do transgene eGFP.

7.5. Análises moleculares das plantas transgênicas em geração T2

Para determinar se o transgene *AdDHN* está sendo expresso nas linhagens em geração T2 em homozigose, análises de expressão gênica relativa foram realizadas por meio da técnica de RT-qPCR. De acordo com essas análises, todas as 13 plantas analisadas expressam o transgene *AdDHN* em níveis que variam de 0,03 a 0,45 vezes o do gene referência utilizado, isto é, o gene actina de *A. thaliana*. A diferença de expressão do transgene *AdDHN* varia de 15,25 vezes entre o evento com a menor expressão relativa (32.5) e aquele com a maior (44.2). Essa variação entre os níveis de expressão do transgene podem ter ocorrido devido ao local de inserção do transgene no DNA da planta ou pelo número de cópias inseridas.

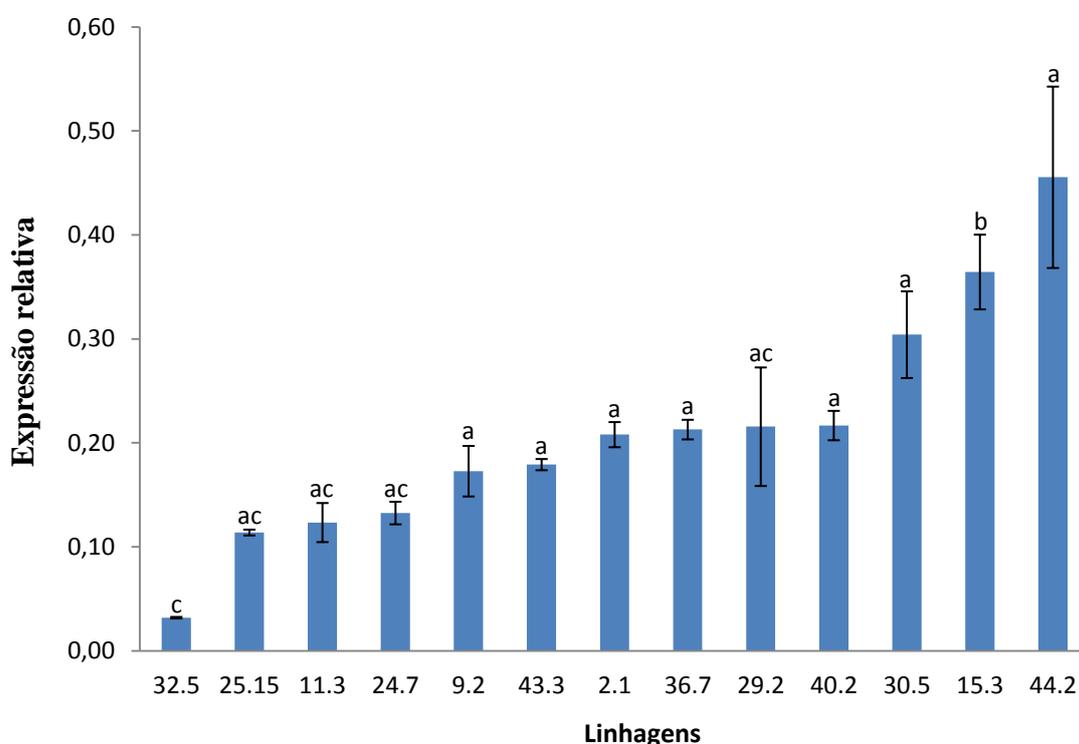


Figura 11. Expressão relativa basal do transgene *AdDHN* de 13 eventos transgênicos de *A. thaliana* selecionados, em relação ao gene actina de *A. thaliana*, utilizado como normalizador. Os valores da expressão relativa foram as médias de três replicatas técnicas e as barras indicam o erro padrão. O teste de análise de variância usado foi o ANOVA ($P \leq 0,05$).

Além do nível de expressão, relativo ao gene de referência actina de *A. thaliana*, a análise da curva de dissociação obtida pela reação de RT-qPCR mostrou que houve apenas um pico de amplificação, indicando que os produtos amplificados são específicos para o gene de interesse *AdDHN* (Figura 13A) e para o gene referência (Figura 13B). A análise da curva de dissociação é importante para garantir que não há contaminações na reação ou amplificações inespecíficas, indicando que os iniciadores foram desenhados corretamente.

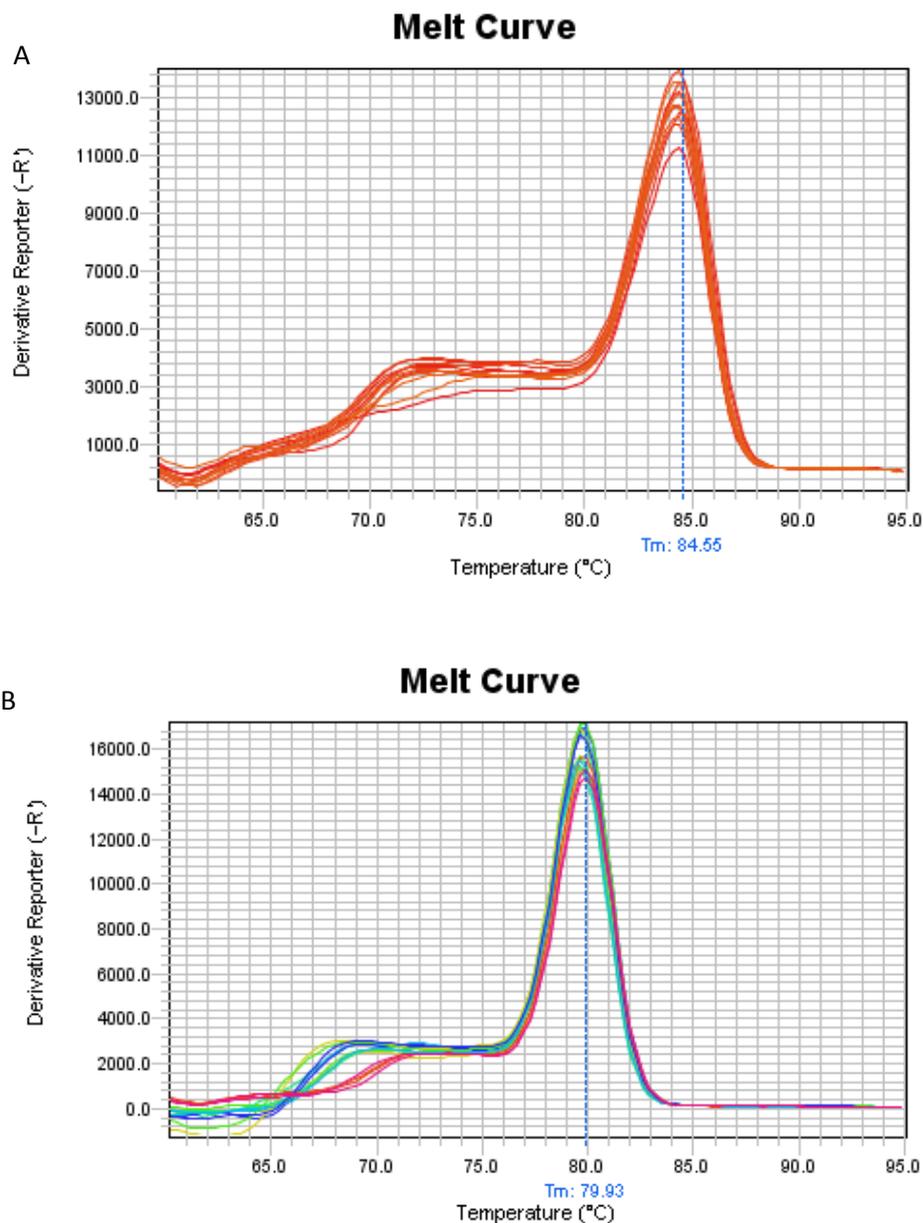


Figura 12. Curva de dissociação da reação de RT-qPCR de 5 plantas, mostrando apenas um produto específico de amplificação do transgene *AdDHN* (A) e do gene referência actina de *A. thaliana* (B).

Para verificar se o produto de amplificação gerados pelos iniciadores desenhados para amplificar a ORF de *AdDHN* não amplificariam alguma outra dehidrina de *A. thaliana*, a sequência da ORF do transgene *AdDHN*, originária de *A. duranensis*, foi alinhada por meio da ferramenta ClustalW com três diferentes sequências de dehidrinas presentes em *A. thaliana* (Figura 14). Essas três dehidrinas foram encontradas por meio da ferramenta BlastN presente no site de *A. thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/cgi-bin/Blast/TAIRblast.pl>), onde a sequência nucleotídica da ORF de *AdDHN* foi inserida e as sequências mais similares à apresentada foram exibidas, junto com seus valores de significância (*e-value*). Das 80 sequências de diferentes dehidrinas que o site apresentou, foram selecionadas as três com menores valores

de *e-value*, que indica maior similaridade entre as sequências nucleotídicas. Essas dehidrinas equivalem a uma dehidrina do tipo COR27 (*Cold-regulated 27*, AT1G20440), uma do tipo XERO1 (AT3G50980) e outra sem notação (AT4G38410). O alinhamento mostrou que a região nucleotídica onde foram desenhados os pares de iniciadores não apresenta qualquer similaridade com a mesma região onde estão alinhadas as três dehidrinas de *A. thaliana* selecionadas.

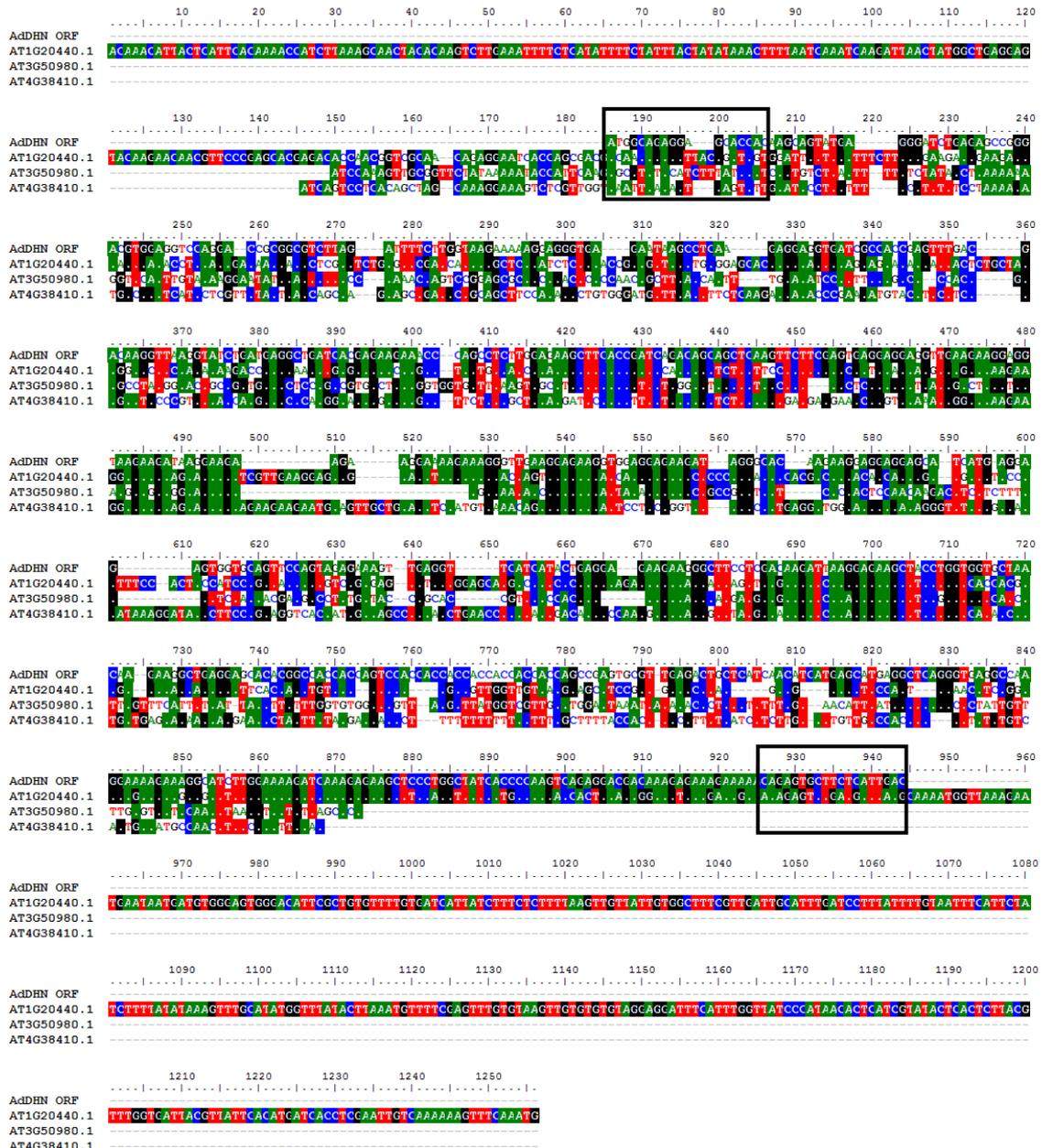


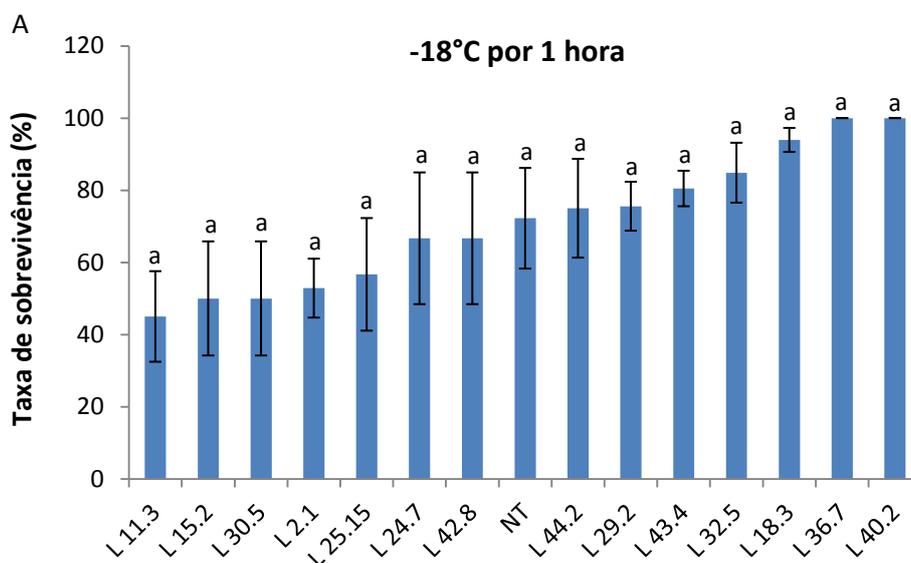
Figura 13. Alinhamento da sequência da ORF de *AdDHN* com sequências de cDNA de três diferentes dehidrinas presentes em *Arabidopsis thaliana* (AT1G20440, AT3G50980 e AT4G38410). Em destaque (retângulos pretos), estão as regiões nucleotídicas onde foram desenhados os iniciadores para amplificar a ORF de *AdDHN*.

7.6. Ensaios de baixa e alta temperatura, NaCl e manitol

7.6.1. Análise da taxa de sobrevivência das plântulas

Todas as 13 linhagens selecionadas quanto à homozigose seguiram para os testes de temperaturas extremas: frio (-18°C por 1 hora) e calor (37°C por 8 horas). Nesses ensaios, foi possível observar que somente uma minoria (5 linhagens) responderam de maneira diferenciada em relação ao controle negativo (planta não-transgênica) ou mesmo em relação às demais linhagens, dentro de cada tratamento. Porém, essas diferenças não foram significativas.

As taxas de sobrevivência das plântulas germinadas de cada linhagem e do controle negativo (planta não-transgênica) foram observadas (Figuras 14A e 14B). No tratamento de frio o controle negativo e os eventos não apresentaram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência, enquanto no tratamento de calor, a linhagem 44.2 apresentou uma taxa de sobrevivência significativamente menor do que 6 linhagens. Esse resultado indica que a superexpressão de *AdDHN* não está influenciando no sentido de aumentar a taxa de sobrevivência das plantas transgênicas quando submetidas aos estresses por temperaturas extremas.



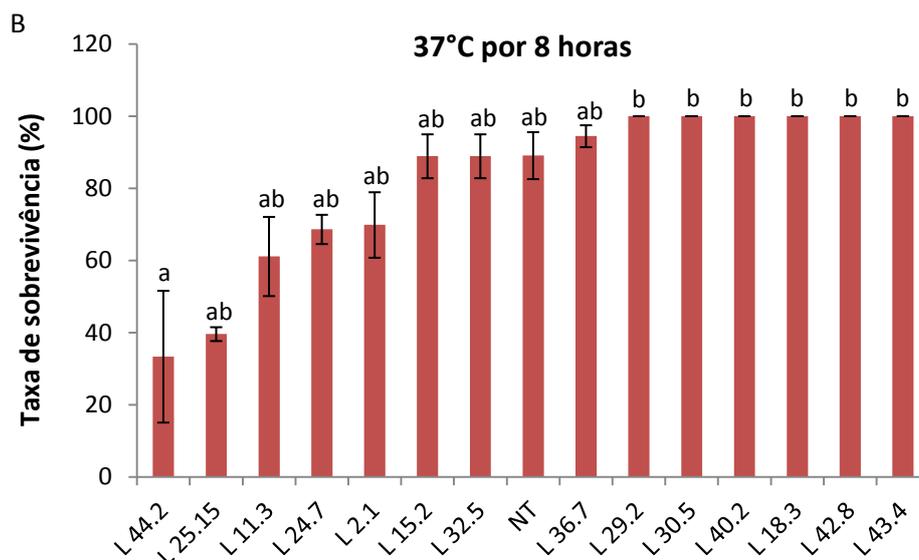


Figura 14. Taxa de sobrevivência das plântulas germinadas de 13 linhagens e da planta não-transgênica (NT), 3 dias após o tratamento a -18°C por 1 hora (A) e a 37°C por 8 horas (B). As taxas de sobrevivências estão representadas por barras e o erro padrão das três repetições técnicas pelas linhas verticais. Foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA ($p \leq 0,05$).

A sobrevivência e o crescimento das plântulas no meio contendo NaCl e manitol foram bastante reduzidos e não foram observadas diferenças entre a não-transformada e as linhagens transgênicas.

7.6.2. Análise do teor de açúcares solúveis totais

As análises do teor de açúcares solúveis totais foram realizadas apenas com as linhagens ou planta não-transgênica que apresentaram maiores taxas de sobrevivência e, portanto, permitiram que houvesse material suficiente para realizar as análises das triplicatas técnicas. Com isso, apenas sete linhagens (L 18.3, L 29.2, L 32.5, L 36.7, L 40.2, L 42.8 e L 43.4), das 13 testadas, foram analisadas quanto aos seus teores de açúcares solúveis totais. Os resultados do teor de açúcares solúveis totais evidenciaram que os teores de açúcares nas plantas das linhagens se mantiveram os mesmos tanto nos indivíduos controles não tratados quanto nos indivíduos tratados com temperaturas extremas. Já nas plantas não-transgênicas, quando comparadas ao grupo controle não tratado, houve aumento no teor de açúcares para indivíduos submetidos ao tratamento de calor e no tratamento de frio as plantas mantiveram seu teor de açúcares solúveis. Esses resultados indicam que a superexpressão de *AdDHN* não modifica o teor de açúcares solúveis totais em condições controle e esses níveis não são alterados quando as plantas transgênicas são submetidas a temperaturas extremas de calor e frio, o que não foi observado nas plantas não-transgênicas, que respondem ao tratamento de calor aumentando o seu teor de açúcares solúveis totais.

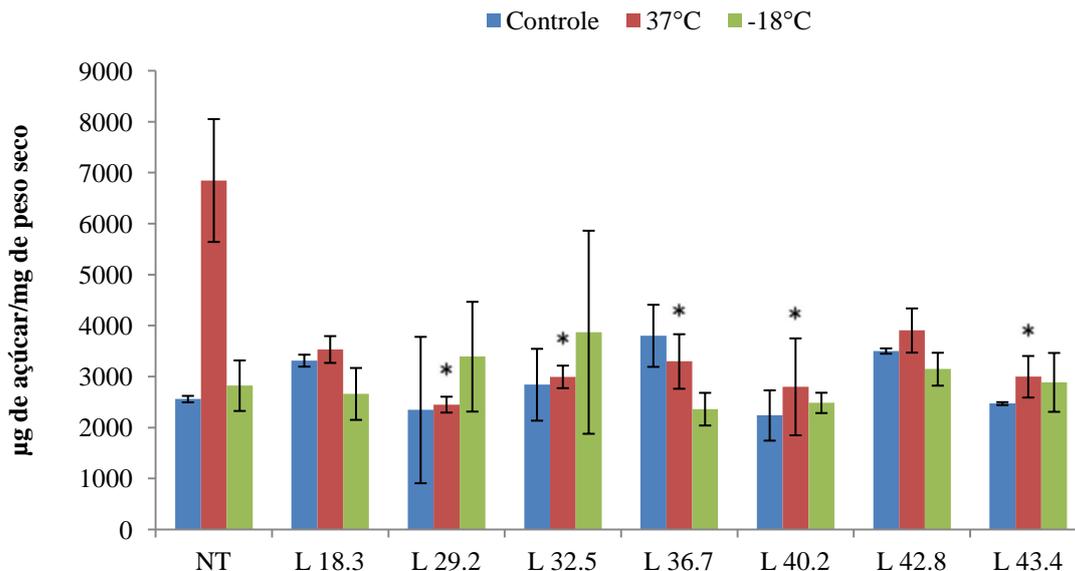


Figura 15. Teor de açúcares solúveis totais das linhagens (L18.3, L29.2, L32.5, L36.7, L40.2, L42.8 e L.43.4) e da planta não-transgênicas (NT), três dias após o tratamento a -18°C durante 1 hora (barras verdes), a 37°C durante 8 horas (barras vermelhas) e sob condições de luz e temperaturas controles (barras azuis). O erro padrão das três repetições técnicas estão representados pelas linhas verticais em cada barra. O efeito significativo de cada tratamento está indicado por asteriscos, e foi usado Teste-T (n=3, P≤0,1).

7.7. Ensaio de déficit hídrico gradual

7.7.1. Análise do fenótipo e da área foliar das plantas submetidas a seca

As linhagens utilizadas para esse ensaio foram selecionadas de acordo com testes de temperaturas extremas feitos anteriormente e levando em consideração as variações na expressão relativa do transgene *AdDHN* em cada linhagem. O fenótipo das plantas transgênicas se mostrou similar ao das plantas não-transformadas (controle negativo) quando sob condições normais de irrigação (Figura 16A). A partir de uma semana início do tratamento (suspensão da irrigação), todas as plantas, transgênicas e não-transgênicas, começaram a mostrar uma coloração mais arroxeada nas folhas, evidenciando que as plantas estavam respondendo ao estresse e indicando o acúmulo de antocianina, apresentando esse fenótipo mais acentuado no final do tratamento, 15 dias sem irrigação (Figura 16B). Além disso, tanto na planta não-transformada quanto em uma das linhagens analisadas (L 11.3) houve a emissão de botões florais, fato que só ocorre antes do esperado em plantas que estão sob forte estresse.

Dois dias após a reidratação, tanto as plantas transgênicas da maioria das linhagens (29 em 40), assim como as plantas não-transgênicas (6 em 10) apresentaram a retomada da cor verde, indicando que as plantas não tinham atingido seu ponto de murcha permanente e que tinham a capacidade de retornar ao seu estado anterior ao estresse. Porém, em relação ao desenvolvimento foliar, no momento da avaliação das plantas reidratadas (2 dias após

reidratação) foram observadas rosetas de tamanhos maiores entre as plantas das linhagens transgênicas quando comparadas às plantas não-transformadas (Figura 16C). Isso pode indicar que as plantas que estão superexpressando *AdDHN* se recuperam mais rápido das injúrias quando submetidas a estresse de déficit hídrico.

As plantas, transgênicas e não-transgênicas, que foram mantidas sob condições normais de irrigação durante os 15 dias de ensaio se mantiveram verdes no decorrer do ensaio e tanto as linhagens quanto as plantas não transformadas apresentaram desenvolvimento foliar aparentemente iguais. No que diz respeito às análises fenotípicas, a superexpressão de *AdDHN* não alterou o fenótipo das plantas em condições normais de irrigação, assim como quando as plantas estavam sob déficit hídrico. Apesar disso, depois que as plantas foram reidratadas as linhagens mostraram, aparentemente, maior desenvolvimento foliar quando comparadas às plantas não transformadas.



Figura 16. Fenótipo das plantas não transgênicas (NT); primeira linha horizontal) e de quatro linhagens transgênicas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5; 2ª a 4ª linha horizontal), antes da retirada da rega (A), no 15º dia sem irrigação (B) e 2 dias após a reidratação (C).

A análise da área foliar pelo programa Rosette Tracker foi realizada nos indivíduos pertencentes a quatro linhagens antes do tratamento e uma semana após o início do tratamento. Tanto as plantas controle não-transgênicas quanto as plantas transgênicas aumentaram sua área foliar com uma semana de estresse, tendo uma linhagem (L 32.5) apresentado maior média de área foliar, porém, sem diferença significativa.



Figura 17. Imagem do programa *Rosette Tracker* detectando as rosetas de *A. thaliana* com diferentes cores para cada indivíduo a fim de medir suas áreas foliares.

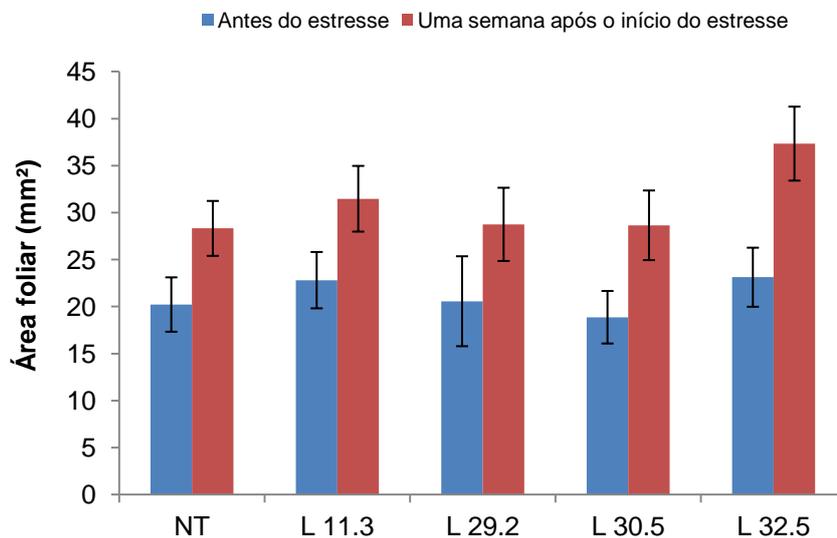


Figura 18. Média das áreas foliares das rosetas de quatro linhagens transgênicas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) e das plantas não-transgênicas (NT) não transgênico antes do estresse e com uma semana de tratamento de déficit hídrico gradual (azul) e com uma semana de tratamento (vermelho). As barras indicam as médias das áreas foliares de 10 plantas e foi usado o teste estatístico de T-Student ($p \leq 0,05$), não apresentando diferença significativa entre plantas transgênicas das quatro linhagens e plantas do controle negativo.

7.7.2. Análise do teor relativo de água

A análise do teor relativo de água mostrou que, em condição normal de irrigação não houveram diferenças significativas entre os teores relativos de água das linhagens e das plantas não-transformadas. Porém, sob estresse hídrico, uma das linhagens analisadas (L 32.5), apresentou maior teor relativo de água quando comparada à planta controle não-transformada, após 15 dias sem irrigação. Esses resultados indicam que a superexpressão de

AdDHN está auxiliando a planta transgênica a reter maior quantidade de água do que a planta não-transformada, em condições de déficit hídrico.

As plantas (transgênicas e não-transgênicas) que ficaram 15 dias sem irrigação e foram reidratadas conseguiram retomar seu teor relativo de água, igualando-se aos teores observados nas suas respectivas plantas controle, que receberam irrigação durante o tempo de suspensão de rega do grupo estressado. Nenhuma linhagem mostrou teor relativo de água diferente das plantas não-transformadas, indicando que após a reidratação o comportamento das plantas contendo o transgene *AdDHN* é igual ao da planta que não contém o transgene *AdDHN*.

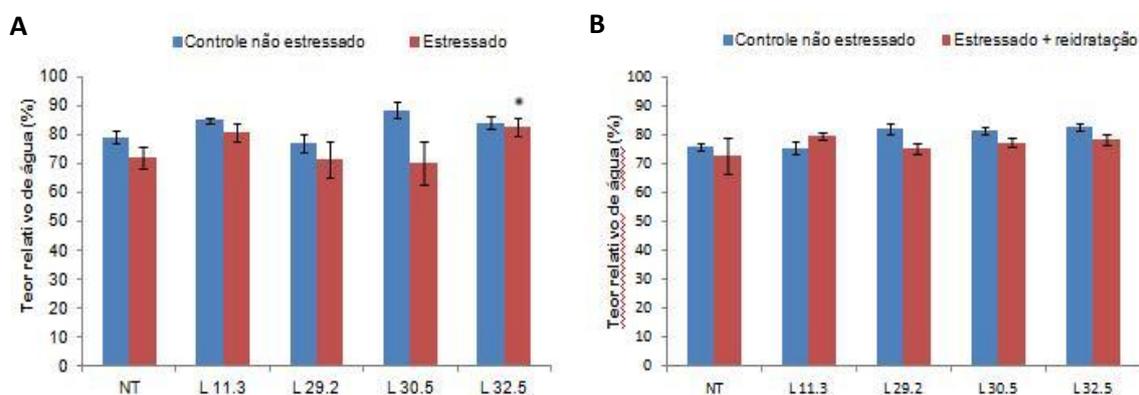


Figura 19. A - Média do teor relativo de água em plantas não transgênicas (NT) e quatro linhagens selecionadas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) sob condições controladas de irrigação durante 15 dias (azul) e após 15 dias sem irrigação (vermelho). B – Média do teor relativo de água em plantas não transgênicas (NT) e quatro linhagens selecionadas (L 11.3, L 29.2, L 30.5 e L 32.5) sob condições controladas de irrigação durante 17 dias (azul) e reidratadas após 15 dias de tratamento de seca (vermelho). O asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e o controle negativo, dentro do mesmo tratamento. O erro padrão está representado por linhas verticais e foi usado o Teste T-Student (n=10, P≤0,05).

7.8. Expressão relativa de ascorbato peroxidase, galactinol sintase e *DREB* em plantas transgênicas de *A. thaliana*

A expressão relativa de três genes de *A. thaliana* foi analisada na linhagem transgênica 32.5: ascorbato peroxidase (*AtAPx*); galactinol sintase (*AtGoIS1*) e o fator de transcrição *DREB* (*Dehydration-responsive binding*) *AtDREB*. Esses três genes foram escolhidos para esse estudo, pois são conhecidamente responsivos a diferentes estresses abióticos, como déficit hídrico e salinidade (Nishizawa et al., 2008; Lata e Prasad, 2011; Chiang et al., 2015). Além do que, esses genes são coexpressos com os dois tipos de desidrina de *A. thaliana* (COR47 e ERD10) mais similares à *AdDHN*, segundo análise feita no site String (<http://string-db.org/>). A linhagem transgênica 32.5 foi escolhida para essas análises pois foi a linhagem que apresentou maior teor relativo de água em relação à planta não-transformada quando submetidas à déficit hídrico. A expressão dos genes *AtAPx*, *AtGoIS1* e *AtDREB* foi normalizada

em relação ao gene referência actina de *A. thaliana* (ACT2) e relativizada na linhagem transgênica 32.5 em relação a plantas não-transgênicas (32.5/NT) ou nos indivíduos tratados em relação aos não tratados (EST/CTR).

A análise da expressão relativa do gene *AtAPx* (Figura 20A) indicou que sua expressão não foi alterada (expressão relativa em torno de ACT2) quando indivíduos da linhagem transgênica 32.5 e do controle não-transgênico foram submetidos a déficit hídrico gradual (EST/CTR; Figura 21A). Entretanto, a expressão de *AtAPx* parece ser induzida pela superexpressão do transgene *AdDHN* (L 32.5/NT). A indução de *AtAPx* na linhagem transgênica 32.5 ocorre tanto em indivíduos submetidos a déficit hídrico gradual (EST), com um aumento da expressão em torno de uma vez, quanto em indivíduos mantidos em irrigação constante (CTR), com um aumento da expressão em torno de uma vez (Figura 21A). Esses resultados mostram que superexpressão do transgene *AdDHN* aumenta a expressão de *AtAPx* em plantas transgênicas e que a mesma não é influenciada pelo déficit hídrico.

A expressão relativa de *AtGoS1* (Figura 20B) mostrou que quando se compara a planta transgênica com a planta não-transgênica em condições normais de irrigação (L 32.5/NT, CTR), ambas apresentam o mesmo nível de expressão relativa de *AtGoS1*, fato que indica que a superexpressão de *AdDHN* não altera a expressão de *AtGoS1* em condição controle. Porém, sob déficit hídrico (EST), a linhagem selecionada apresenta o nível de expressão de *AtGoS1* 1,5 vezes maior do que a planta não-transformada (L 32.5/NT) e quando a linhagem sob estresse é comparada ao seu controle (L 32.5/L 32.5, EST/CTR), o nível de expressão de *AtGoS1* é 0,5 vezes maior. E, ainda, o nível de expressão de *AtGoS1* não é alterado quando se compara a planta não-transformada estressada com o seu controle (NT/NT, EST/CTR). Então, o que os dados indicam é que a superexpressão de *AdDHN* só altera os níveis de expressão de *AtGoS1* quando as plantas transgênicas estão sob estresse.

E com os dados de expressão gênica de *DREB* (Figura 20C) é possível concluir que, em condições normais de irrigação (CTR), a expressão relativa de *DREB* aumenta quase duas vezes mais na linhagem selecionada quando comparada à planta não-transformada (L 32.5/NT). Já sob tratamento de seca (EST), a expressão relativa de *DREB* é quase uma vez maior na planta transgênica do que na planta não-transgênica (L 32.5/NT), indicando que, a superexpressão de *AdDHN* aumenta os níveis de expressão relativa de *DREB* tanto em condição normal de irrigação quanto sob estresse hídrico. As comparações da linhagem estressada com seu controle (L 32.5/L 32.5, EST/CTR), que apresentou nível de expressão relativa de *DREB* duas vezes maior, e da planta não-transformada estressada com seu controle (NT/NT, EST/CTR), que apresentou nível de expressão relativa de *DREB* 4,5 vezes maior, indicam que a expressão de *DREB* é também influenciada pelo tratamento de seca.

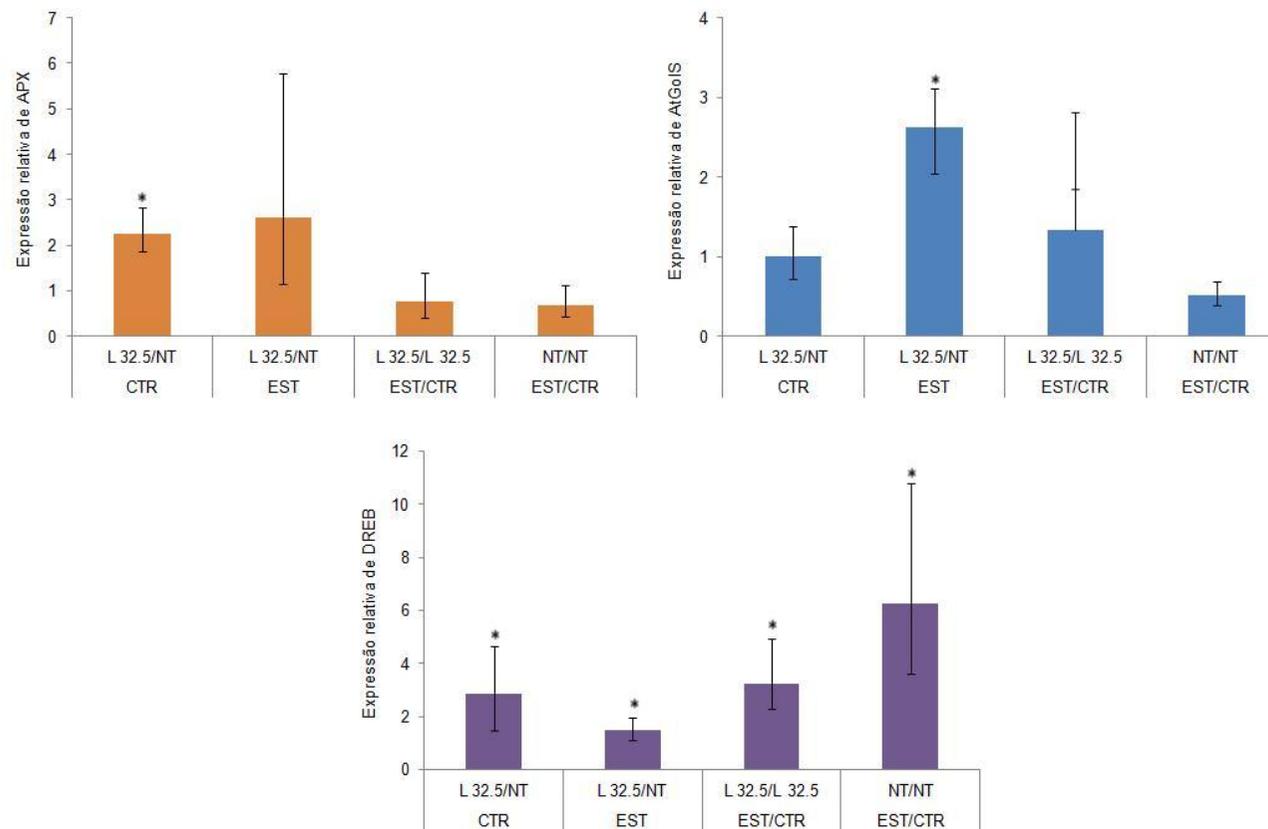


Figura 20. Expressão relativa dos genes ascorbato peroxidase (A), galactinol sintase (B) e *DREB* (C) em plantas de *A. thaliana*. A primeira barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 e da planta não-transgênica (NT) sob condições de irrigação normal (CTR). A segunda barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 e da planta não-transgênica (NT) sob condições de estresse hídrico (EST). A terceira barra corresponde à expressão relativa dos genes em indivíduos da linhagem transgênica 32.5 sob condições de estresse hídrico (EST) e sob condições de irrigação normal (CTR). A quarta barra corresponde à expressão relativa dos genes em plantas não-transgênicas sob condições de estresse hídrico (EST) e sob condições de irrigação normal (CTR). O asterisco indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, calculada pelo programa *Rest*.

8. DISCUSSÃO

Na natureza, as plantas estão expostas a múltiplas e variadas situações de estresse. Os estresses abióticos, como seca, salinidade e temperaturas extremas, atingem uma ampla área agricultável e podem diminuir drasticamente a produtividade afetando sobremaneira a sobrevivência das plantas (Cramer et al., 2011).

Uma vez que os diferentes tipos de estresse são percebidos pelas plantas, várias vias de respostas moleculares são acionadas e genes são ativados para garantir sua sobrevivência em condições adversas (Vinocur and Altman, 2005). Esse é o caso dos genes que codificam proteínas conhecidas como Dehidrinas, que são proteínas do tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que se acumulam em tecidos que estão sofrendo desidratação (Wise and Tunnacliffe, 2004), assim como há também vários estudos as relacionando com a tolerância ao frio (Imamura et al., 2013), sal (Saibi et al., 2015) e calor (Brini et al., 2010).

No presente estudo, o gene que codifica uma Dehidrina de *Arachis duranensis* (*AdDHN*) foi caracterizado, clonado e transferido para plantas transgênicas de *A. thaliana* visando estudar os efeitos pleiotrópicos de sua superexpressão na resposta dessas plantas a diferentes estresses abióticos.

8.1. Caracterização molecular de *AdDHN*

Dehidrinas podem se diferenciar quanto ao número de domínios conservados e suas posições na estrutura proteica (Allagulova et al., 2003; Rorat, 2006; Chiappetta et al., 2015). A Dehidrina codificada pelo gene *AdDHN* de *A. duranensis* foi aqui caracterizada como do tipo SK₂. Segundo Close (1996), Dehidrinas desse tipo estão incluídas no grupo SK_n, que tem como representantes tanto Dehidrinas do tipo SK₂ quanto do tipo SK₃. O alinhamento da sequência proteica deduzida de *AdDHN* com a sequência peptídica de Dehidrinas de outras espécies leguminosas mostrou alta similaridade (98,2% para o domínio S, 99,6% para o primeiro domínio K e 97,6% para o segundo domínio K) entre os domínios conservados típicos de SK₂.

A função das Dehidrinas do tipo SK₂ ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que ela está envolvida principalmente nas respostas aos estresses de frio e desidratação (Hanin et al., 2011). Três Dehidrina foram isoladas do amendoim cultivado (*A. hypogaea*) e caracterizadas como sendo dos tipos YnSK_n, YnKn e SK_n (Su et al., 2012). Essas Dehidrinas (*AhDHNs*) mostraram-se responsivas a tratamento com tungstato (que é um supressor de ABA), onde as expressões das *AhDHN* foram reduzidas, indicando que a supressão de ABA também diminuía a expressão das *AhDHN*. Entretanto, este é o primeiro estudo de caracterização de uma Dehidrina de espécies silvestres de *Arachis*. *A. duranensis* é um dos parentais silvestres do amendoim cultivado (*A. hypogaea*), e tem seu centro de origem na América do Sul, principalmente em regiões do Cerrado, caracterizada pela seca acentuada nos períodos de inverno. Por isso, *A. duranensis* desenvolveu, ao longo de sua evolução, mecanismos de adaptação à deficiência hídrica e é por esse motivo que estudos anteriores (Guimaraes et al., 2012; Brasileiro et al., 2015) fizeram o perfil do transcriptoma de *A.*

duranensis durante tratamento de seca (*dry-down*) e validaram por RT-qPCR os genes diferencialmente expressos sob condições de seca e sob condições normais de irrigação.

8.2. Obtenção e caracterização de plantas transgênicas de *A. thaliana* expressando AdDHN

A literatura descreve que a transformação de *A. thaliana* por meio da técnica de imersão de botões florais tem uma eficiência média de 1%, ou seja, a cada 100 sementes T0 obtidas após a transformação apenas uma será transformada (Desfeux et al., 2000). No presente trabalho, a eficiência de transformação de *A. thaliana* pela linhagem de *A. tumefaciens* contendo o vetor pZP-AdDHN foi de 1,17%, mostrando que em nossas condições de laboratório foi possível reproduzir com sucesso o protocolo descrito na literatura. Provavelmente isso ocorreu por um conjunto de condições respeitadas (Godwin et al, 1992), como a sacarose como fonte de carbono para *A. tumefaciens* a uma concentração de 5% e temperatura de crescimento entre 27 e 30°C. O tempo entre a primeira e a segunda imersão dos botões florais, que deve ser de 5 a 6 dias. Além disso, a correta manutenção da umidade (80%) e temperatura (22 ±2°C) foi realizada, propiciando o ambiente ideal para que a transformação acontecesse com sucesso (Clough e Bent, 1999; Oliveira, 1999; Brasileiro e Carneiro, 2015).

A análise molecular por meio de PCR das plantas transgênicas obtidas na geração T1 permitiu confirmar a presença dos transgenes e, posteriormente, por meio de RT-qPCR, foi possível confirmar a expressão dos mesmos em plantas transgênicas na geração T2. A seleção visual das plantas transformadas foi feita por sua segregação em meio contendo higromicina, e em T1 a segregação esperada era de 0,75% de plantas transformadas para 0,25% de plantas não-transformadas, porém, a segregação observada foi menor, variando de 0,025% a 0,075%. Segregações menores que a esperada já foram observadas em trabalhos anteriores (Xie, 2001), fato que é atribuído ao número de cópias do transgene inserido no DNA da planta. De acordo com Hensel et al. (2012) e Singh et al. (2015), quando é observada a proporção 3:1, normalmente há uma cópia inserida no DNA da planta transgênica, em contrapartida, quando a proporção observada é maior do que 3:1, geralmente há mais de um número de cópia do transgene inserido no DNA da planta.

A seleção de plantas transgênicas por resistência à higromicina não altera a germinação das plantas, porém, as plantas não transformadas apresentam menor desenvolvimento até que atingem a morte. Azmi (2014) mostrou que, o método de seleção por higromicina é eficaz quando é colocada a concentração correta de higromicina no meio, variando de 20 a 40 mg/L, enquanto no presente estudo foram usados 50 mg/L, fato que pode ter interferido na segregação das plantas transformadas.

Outro método de seleção das plantas transgênicas foi com a verificação da fluorescência da eGFP. Em algumas plantas foi possível ver a fluorescência apenas nas raízes ou em tecidos que estavam em desenvolvimento, levando a crer que seria uma planta quimérica, porém, fez-se PCR da parte aérea da planta e o transgene estava inserido no DNA da mesma.

O que pode explicar isso é o fato da detecção de GFP ser reduzida em tecidos mais desenvolvidos devido ao espalhamento do sinal de fluorescência ao longo tecido, sendo mais fácil fazer essa detecção em tecidos menores ou em desenvolvimento e quando há níveis médios a altos de GFP (Ruijter et al., 2003).

A análise da expressão relativa de *AdDHN* nas 13 linhagens T2 em homozigose mostrou uma variação de 15,25 vezes entre a linhagem de menor expressão relativa (0,03) e aquela de maior (0,46). Esse resultado já era esperado visto que cada evento T0 de transformação é único, seja pelo local de inserção do transgene no DNA da planta ou pelo número de cópias inseridas ou pelo tipo (em série, na mesma direção, invertido, aleatórios no genoma, etc.) de inserção dessas cópias (Kohli et al., 2010). Essas características únicas de cada evento T0 são transferidas para as futuras gerações T1 e T2 e podem explicar as diferenças fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas observadas entre as linhagens derivadas dos diferentes eventos T0 em respostas aos tratamentos impostos. O local de inserção do gene pode modificar bastante a sua expressão, genes próximos ao transgene ou fatores de transcrição podem modular a sua expressão, assim como a inserção em regiões de heterocromatina ou de regiões repetitivas podem levar ao silenciamento do transgene (Goldsbrough and Bevan, 1991; Takano et al., 1997; Tamura et al., 2016). O número de cópias e a maneira como elas são inseridas no DNA da planta também interferem no nível de expressão do transgene, e geralmente múltiplas cópias do transgene resulta no seu silenciamento, seja por metilação, co-supressão ou transinativação (Gang et al., 2002; Hensel et al., 2012)

8.3. Efeito da superexpressão de *AdDHN* na resposta ao frio e ao calor

Durante estresses abióticos, é comum as plantas responderem com mudanças nas concentrações de seus componentes celulares, como o aumento da produção de açúcares, que servem como osmólitos para as células não perderem água e, dessa maneira, se conservarem íntegras (Vinocur and Altman, 2005). No presente estudo, as sete linhagens transgênicas de *A. thaliana* avaliadas quanto ao seu teor de açúcar, mostraram níveis de açúcares iguais ao do controle não-transgênico, tanto em condição controle quanto no tratamento com frio. Esses resultados sugerem que a superexpressão de *AdDHN* não altera os teores de açúcares solúveis totais em condições controle, que, portanto, a expressão constitutiva de *AdDHN* não interfere nas vias de biossíntese de açúcares solúveis totais. A superexpressão de uma Dehidrina do tipo SK₃ mostrou também esse mesmo resultado, com os níveis de açúcares solúveis da planta não transformada e das linhagens não variando em condição controle, porém, houve o aumento desses níveis nas linhagens quando submetidas a condições de frio (Puhakainen et al., 2004). Durante o tratamento com frio, geralmente há o aumento dos níveis de açúcares solúveis, mesmo nas plantas não-transformadas (Janmohammadi et al., 2015), mas no presente estudo não foi observado isso. Esse fato indica que, embora a temperatura tenha sido ideal para o experimento, pode-se pensar que o tempo de exposição ao estresse pode ter sido baixo.

No ensaio com alta temperatura, a planta não-transformada mostrou significativo aumento no teor de açúcares solúveis totais, indicando que a planta estava passando por estresse osmótico, e aumentou seus níveis de açúcares para tentar manter seu teor celular de água, assim como descrito em Hiden et al. (2012) e Shao et al. (2012). Esse resultado sugere que sob estresse de alta temperatura, as plantas que superexpressam *AdDHN* não estão respondendo no sentido de aumentar o teor de seus açúcares solúveis. Pode ser que o transgene esteja interferindo em algum passo da via de biossíntese desses açúcares, fazendo com que seus níveis se mantenham constantes, não importando o estresse a que a planta é submetida.

8.4. Efeito da superexpressão de *AdDHN* na resposta ao déficit hídrico

Durante o ensaio de déficit hídrico gradual, observou-se que as linhagens transgênicas e as plantas não-transformadas tornaram-se arroxeadas, indicando o acúmulo de antocianina nas folhas. Antocianinas são pigmentos solúveis em água, derivados de flavonoides, que por sua vez são antioxidantes (Chalker-Scott, 1999) e sua produção pode ser induzida em resposta ao tratamento de frio (Li et al., 2015), ao estresse osmótico (Meng et al., 2014), ao estresse por alta salinidade (Van Oosten et al., 2013) e a estresse bióticos (Park et al., 2015). Assim como no presente estudo, Tattini et al. (2004) também verificou o acúmulo de flavonoides em plantas submetidas ao déficit hídrico e atribuiu esse acúmulo à função de proteção antioxidante dos flavonoides. Esse resultado era esperado, visto que vários compostos do metabolismo secundário (fenilpropanóides, terpenóides e flavonoides) são acumulados quando a planta está sofrendo algum tipo de estresse, agindo como eficientes antioxidantes (Treutter, 2006). Após a reidratação houve a retomada da cor verde das plantas, tanto nas linhagens testadas quanto nas plantas não-transformadas, indicando a normalização da produção de antocianina e a possível sinalização de que a planta não estava mais sob estresse de seca.

A área foliar das linhagens transgênicas e do controle negativo não-transgênico também foi medida para avaliar o desenvolvimento das plantas uma semana após o início do estresse. Massonnet et al. (2015) sugerem que, o tamanho da área da roseta varia menos sob condições de déficit hídrico em rosetas que naturalmente já são pequenas. De acordo com a Figura 18 é possível observar que a média das áreas foliares das rosetas não variavam significativamente antes do estresse, fato que, portanto, não influenciou nos resultados futuros em relação a área foliar. Os resultados obtidos indicaram um maior desenvolvimento, embora não significativo, da área foliar em uma das linhagens transgênicas avaliadas (L 32.5) em relação ao controle não-transgênico após o estresse, assim como já foi visto em plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando uma *DHN5* de trigo (Saibi et al., 2015) e uma Dehidrina do tipo SK₂ de oliva (Chiappetta et al., 2015). Uma maior taxa de crescimento foliar na linhagem transgênica 32.5 (em média 1,32 vezes maior que no controle) submetida a um déficit hídrico sugere que a superexpressão de *AdDHN* não está interferindo na diminuição do desenvolvimento foliar das plantas transgênicas, e as células estão se expandindo como se não houvesse estresse, pois,

sob estresse há o ajuste da área foliar, no intuito de diminuir a área de transpiração e perder menos água para o ambiente externo (Lawlor, 2013).

O teor relativo de água (TRA) das linhagens transgênicas e do controle não-transgênico, após 15 dias de estresse de seca, 2 dias após a reidratação e sob condições de irrigação regular, também foi medido para avaliar se havia diferença entre a capacidade de retenção de água de cada indivíduo, na condição de controle da irrigação e sob tratamento de seca. Os resultados obtidos revelaram que, em uma visão geral, sob déficit hídrico, tanto as linhagens quanto a planta não-transformada diminuíram seu teor relativo de água. O TRA indica a porcentagem de água presente no exato momento de coleta do material em relação à sua máxima capacidade de conteúdo de água e à sua capacidade mínima. A maioria das plantas possui, em condições normais de irrigação, uma média de teor de água entre 80 e 90% em suas partes verdes (Guimarães e Stone, 2008). No nosso ensaio, três linhagens transgênicas (L 11.3, L 30.5 e L 32.5) de *A. thaliana* expressando *AdDHN* exibiram maior teor relativo de água quando comparado ao controle não-transgênico em condições de irrigação regular. Após 15 dias de estresse de seca duas dessas três linhagens mantiveram teores relativos de água maiores que o da planta não-transgênica. E após 2 dias decorridos da reidratação, os teores de controle e o anteriormente estressado voltaram a se igualar estatisticamente. Em particular, a linhagem 32.5 apresentou significativa diferença no teor relativo de água de suas plantas estressadas comparadas às plantas não-transgênicas estressadas, mostrando mais uma vez a variação entre as linhagens.

Geralmente, uma das mais evidentes respostas fisiológicas das plantas tolerantes a condições de seca é o acúmulo de açúcares, ácidos orgânicos e íons no citosol para diminuir o potencial osmótico e, com isso, manter o potencial hídrico e o turgor de suas células (Bray, 1997). Em folhas jovens o TRA é alto e vai decaindo com a idade ou quando a planta está sob estresse, isso reflete a atividade metabólica do tecido, quanto maior o conteúdo relativo de água, maior a atividade metabólica (Anjum et al., 2011). Em cana de açúcar, observou-se que a cultivar tolerante à seca (RB867515) manteve seu TRA maior quando comparada a cultivar sensível sob condições de déficit hídrico (Vital, 2014) assim como em outros trabalhos envolvendo plantas transgênicas de *A. thaliana*, híbrido de *Populus* e tabaco mais tolerantes à seca (Brini et al., 2007; Wang et al., 2011; Li et al., 2013) que mantiveram seu TRA alto mesmo após o estresse. Os dados obtidos no presente trabalho confirmam esses estudos ao mostrar que, mesmo em condições de irrigação regular, linhagens transgênicas de *A. thaliana* expressando *AdDHN*, em particular a linhagem 32.5, exibiram maior TRA quando comparado ao controle não-transgênico, ficando evidente que a expressão do transgene *AdDHN* está influenciando a capacidade de retenção de água das plantas transgênicas mesmo sem as mesmas estarem sob efeito do estresse.

É interessante observar que a linhagem 32.5 que possui o maior TRA é também a linhagem que apresenta a maior taxa de crescimento foliar. Esses resultados demonstram que houve maior retenção de água nas linhagens transgênicas, indicando que, nessas plantas, pode ter havido melhor aproveitamento da água do solo pelas raízes ou menor perda por

transpiração, com maior eficiência no controle de abertura estomática. A Dehidrina é uma proteína que é capaz de mudar sua conformação e se ligar, por meio de ligações hidrofílicas, a moléculas de água e a íons, o que pode ser uma das explicações para o maior teor de água nas plantas que estão expressando constitutivamente o *AdDHN*, pois ao mesmo tempo que a Dehidrina se liga em moléculas de água ela pode fazer ligações com íons que aumentarão o potencial osmótico das células, fazendo com que elas percam menos água (Rorat, 2006; Patil and Sujit Kumar, 2014; Banerjee and Roychoudhury, 2015). Assim, a superexpressão da Dehidrina SK2 de *A. duranensis* em plantas transgênicas pode ter aumentado a pressão de turgor dentro de suas células, tornando plantas mais vigorosas e com maior taxa de crescimento. Além disso, é comum que plantas superexpressando genes responsivos a ABA (ácido abscísico), como a dehidrina, respondam ao déficit hídrico com o maior controle na abertura estomática para reduzir a transpiração e dessa maneira diminuam sua perda de água (Yao et al., 2012).

8.5. Análise da expressão de ascorbato peroxidase, galactinol sintase e *DREB* em plantas transgênicas superexpressando *AdDHN*

É de amplo conhecimento que a resposta das plantas à seca é uma resposta multigênica complexa, envolvendo a regulação da expressão de vários genes, desencadeando cascatas de respostas (Vinocur e Altman, 2005). No presente estudo, três genes conhecidamente induzidos pela seca (*APx*, *GoIS1* e *DREB*) foram selecionados para avaliar os mecanismos moleculares desencadeados pela superexpressão de uma Dehidrina. As análises da expressão relativa de *APx*, *GoIS1* e *DREB* foram feitas com o objetivo de observar o efeito da superexpressão constitutiva de *AdDHN* na expressão dos genes selecionados, em condições de irrigação regular e em condições de estresse por déficit hídrico.

Analisando os níveis de expressão relativa de *APx*, evidenciou-se que a superexpressão *AdDHN* induziu a sua expressão. A indução de *APx* pode ter acontecido porque a Dehidrina atua como chaperona, interagindo com outras proteínas e enzimas, protegendo-as de possíveis degradações, em condições de estresse. A *APx* é uma proteína que atua como enzima, utilizando ascorbato como substrato para catalisar a reação de peróxido de hidrogênio (Espécie Reativa de Oxigênio) em água, ou seja, a *APx* tem o papel de limpar os radicais livres que são produzidos em maior quantidade em células que sofreram estresse. A possível ligação entre Dehidrina e *APx* seria por meio das ligações anfipáticas que a Dehidrina é capaz de fazer para proteger, no caso, outra proteína, e assim contribuir para que a integridade de *APx* seja mantida durante o estresse e ela consiga desempenhar seu papel de antioxidante.

A análise dos dados de expressão gênica de *GoIS1* revela que sua expressão não é influenciada pela superexpressão de *AdDHN* quando em condições controle, mas sim quando sob estresse. Esperava-se que a expressão de *AtGoIS1* aumentasse durante o estresse hídrico, porém, em plantas não-transgênicas os níveis se mantiveram iguais aos do controle não estressado. Assim, a superexpressão de *AdDHN* influencia a expressão de *GoIS1* somente quando a planta está sob estresse, sugerindo que a expressão constitutiva de *AdDHN* induz

vias de biossíntese de GolS1 que durante condições controle não são ativadas mas a junção dos dois fatores, transgene e estresse, é a condição mínima necessária para que seja sinalizada a maior produção de GolS1. A GolS1 é uma proteína que possui função catalítica, atuando na primeira etapa da síntese de rafinose, carboidrato solúvel, que serve como osmoprotetor. Segundo Taji et al. (2002), dos sete genes que codificam uma GolS1 em *A. thaliana* três são estresse-responsivos, enquanto os outros quatro são expressos constitutivamente. Assim, tendo em vista que a superexpressão de *AdDHN* influencia a expressão de GolS1 somente quando a planta está sob estresse, é possível que a expressão constitutiva de *AdDHN* induz vias de biossíntese de GolS1 que durante condições controle não são ativadas mas a junção dos dois fatores, transgene e estresse, é a condição mínima para que seja sinalizada a maior produção de GolS1. Além disso, outro estudo mostrou o perfil do transcriptoma durante o déficit hídrico, e, além de outros genes, o desidrina e o GolS1 são expressos simultaneamente (Collett et al., 2004).

Com relação ao gene *DREB*, observou-se que sua expressão é aumentada em situação de estresse, tanto em plantas não-transgênicas como nas transgênicas. Esse resultado corrobora trabalhos anteriores (Yamaguchi-shinozaki e Shinozaki, 2006; Lata e Prasad, 2011) que elucidam o papel de *DREB* como fator de transcrição que regula a expressão de genes responsivos ao estresse de desidratação, por meio de ligações em seus promotores. No presente estudo, mostrou-se que a expressão de *DREB* não só aumenta sob condições de estresse, como também quando a planta está superexpressando de maneira constitutiva a *AdDHN*. É possível que a superexpressão constitutiva de *AdDHN* sinalize para a maquinaria fisiológica da planta que a mesma está sob estresse, mesmo quando a mesma está em condições de normais de não-estresse. Assim, há o aumento do nível de expressão de *DREB* e de tantos outros genes responsivos à seca.

9. CONCLUSÃO

- A superexpressão de *AdDHN* fez com que as plantas transgênicas submetidas ao déficit hídrico tivessem maiores áreas foliares quando comparadas às plantas não-transgênicas;
- A superexpressão de *AdDHN* alterou o ajuste osmótico das plantas submetidas ao frio e ao calor;
- A superexpressão de *AdDHN* alterou a expressão de ascorbato peroxidase, galactinol sintase e *DREB*, tanto em condições controle quanto em condições de déficit hídrico.

10. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, abaixo são listadas algumas perspectivas de uso desses dados pela equipe *Arachis*.

- Serão feitos ensaios de seca com o restante das linhagens que não foram testadas para a esse tipo de estresse.
- Os teores de açúcares solúveis totais e de aminoácidos totais das plantas que sofreram estresse hídrico serão analisados.
- Os teores de aminoácidos totais das plantas que sofreram estresse de calor e frio serão determinados.
- O presente trabalho servirá como exemplo de otimização de protocolos para o grupo testar novos genes-candidatos, vindos de espécies silvestres de *Arachis*, na tolerância aos estresse abióticos e bióticos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAGULOVA, C.R., F.R. GIMALOV, F.M. SHAKIROVA, and V. A. VAKHITOV. 2003. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* 68: 945–951.
- ANJUM, S., X. XIE, and L. WANG. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6: 2026–2032.
- AZMI, N. 2014. EFFECTIVE HYGROMYCIN CONCENTRATION FOR SELECTION OF Agrobacterium -MEDIATED TRANSGENIC *Arabidopsis thaliana*. 43: 119–123.
- BANERJEE, A., and A. ROYCHOUDHURY. 2015. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins : structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regulation*.
- Bent, F. B., & Clough, S. J. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J*, 16, 735-743.
- BERTIOLI, D.J., G. SEIJO, F.O. FREITAS, J.F.M. VALLS, S.C.M. LEAL-BERTIOLI, and M.C. MORETZSOHN. 2011. An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources* 9: 134–149.
- BLUM, A. 2011. Plant Breeding for Water-Limited Environments. Springer New York, New York, NY.
- BOYES, D.C., A M. ZAYED, R. ASCENZI, A J. MCCASKILL, N.E. HOFFMAN, K.R. DAVIS, and J. GÖRLACH. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant cell* 13: 1499–510.
- BRASILEIRO, A.C.M., and V. DE C. CARNEIRO. 2015. Manual de transformação genética de plantas. 2ª Edição. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.
- BRASILEIRO, A.C.M., C. V. MORGANTE, A.C.G. ARAUJO, S.C.M. LEAL-BERTIOLI, A.K. SILVA, A.C.Q. MARTINS, C.C. VINSON, ET AL. 2015. Transcriptome Profiling of Wild *Arachis* from Water-Limited Environments Uncovers Drought Tolerance Candidate Genes. *Plant Molecular Biology Reporter*.
- BRAY, E.A. 2001. Plant Response to Water-deficit Stress. 1–5.
- BRAY, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48–54.
- BRINI, F., M. HANIN, V. LUMBRERAS, I. AMARA, H. KHOUDI, A. HASSAIRI, M. PAGÈS, and K. MASMOUDI. 2007. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 26: 2017–2026.
- BRINI, F., W. SAIBI, I. AMARA, A. GARGOURI, K. MASMOUDI, and M. HANIN. 2010. Wheat Dehydrin DHN-5 Exerts a Heat-Protective Effect on β -Glucosidase and Glucose Oxidase Activities. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74: 1050–1054.
- CAMPBELL, S. A., & CLOSE, T. J. 1997. DEHYDRINS: GENES, PROTEINS, AND ASSOCIATIONS WITH PHENOTYPIC TRAITS. *NEW PHYTOLOGIST*, 137(1), 61-74.
- CHALKER-SCOTT, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70: 1–9.
- CHIANG, C.M., H.L. CHIEN, L.F.O. CHEN, T.C. HSIUNG, M.C. CHIANG, S.P. CHEN, and K.H. LIN. 2015. Overexpression of the genes coding ascorbate peroxidase from *Brassica campestris* enhances heat tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 59: 305–315.
- CHIAPPETTA, A., A. MUTO, L. BRUNO, M. WOLOSZYNSKA, M. VAN LIJSEBETTENS, and M.B. BITONTI. 2015. A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–15.
- CHU, Y., L.A. GUIMARÃES, C.L. WU, and T. CAMPUS. 2014. A Technique to Study Meloidogyne arenaria Resistance in Agrobacterium rhizogenes -Transformed Peanut. *APS Journals* 98: 1292–1299.
- Close, T. J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4), 795-803.
- CLOUGH, S.J., and A.F. BENT. 1999. Floral dip : a simplified method for Agrobacterium-

- mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. 16: 735–743.
- COLLETT, H., A. SHEN, M. GARDNER, J.M. FARRANT, K.J. DENBY, and N. ILLING. 2004. Towards transcript profiling of desiccation tolerance in *Xerophyta humilis*: Construction of a normalized 11 k X . *humilis* cDNA set and microarray expression analysis of 424 cDNAs in response to dehydration. *Physiologia Plantarum* 39–53.
- COVERT, S.F., P. KAPOOR, M. LEE, A. BRILEY, and C.J. NAIRN. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* 105: 259–264.
- CRAMER, G. R., URANO, K., DELROT, S., PEZZOTTI, M., & SHINOZAKI, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 163.
- DELATORRE, C. A., & SILVA, A. A. D. 2008. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias. Lisboa, Portugal. Vol. 31, n. 2 (dez. 2008), p. 58-67.*
- DESFEUX, C., CLOUGH, S. J., & BENT, A. F. 2000. FEMALE REPRODUCTIVE TISSUES ARE THE PRIMARY TARGET OF AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION BY THE ARABIDOPSIS FLORAL-DIP METHOD. *PLANT PHYSIOLOGY*, 123(3), 895-904.
- DEVOS, K. M., & GALE, M. D. 2000. GENOME RELATIONSHIPS: THE GRASS MODEL IN CURRENT RESEARCH. *THE PLANT CELL*, 12(5), 637-646.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES, J.K. HAMILTON, P. A. REBERS, and F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356.
- Ee, S. F., Khairunnisa, M. B., Hussein, Z. A. M., Noor Azmi, S., & Zainal, Z. 2014. Effective hygromycin concentration for selection of *Agrobacterium*-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Malaysian Applied Biology*, 43(1), 119-123.
- FIGUERAS, M., J. PUJAL, A SALEH, R. SAVÉ, M. PAGÈS, and A. GODAY. 2004. Maize Rab17 overexpression in *Arabidopsis* plants promotes osmotic stress tolerance. *Annals of Applied Biology* 144: 251–257.
- FRANÇA, M.B., A. D. PANEK, and E.C. A. ELEUTHERIO. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146: 621–631.
- GOLDSBROUGH, A., & BEVAN, M. 1991. NEW PATTERNS OF GENE ACTIVITY IN PLANTS DETECTED USING AN AGROBACTERIUM VECTOR. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY*, 16(2), 263-269.
- GUIMARÃES, C.M., and L.F.S. STONE. 2008. Métodos de Avaliação das Condições Hídricas das Plantas. *Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico on-line* 1–8.
- GUIMARAES, P.M., A.C. BRASILEIRO, C. V MORGANTE, A.C. MARTINS, G. PAPPAS, O.B. SILVA, R. TOGAWA, ET AL. 2012. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics* 13: 387.
- GUTHA, L. R., REDDY, A. R. 2008. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the over-expression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* 68:533–555.
- HANIN, M., F. BRINI, C. EBEL, Y. TODA, S. TAKEDA, and K. MASMOUDI. 2011. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1503–1509.
- HARA, M. 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany* 56: 2695–2703.
- HENSEL, G., OLESZCZUK, S., DAGHMA, D. E. S., ZIMNY, J., MELZER, M., & KUMLEHN, J. 2012. ANALYSIS OF T-DNA INTEGRATION AND GENERATIVE SEGREGATION IN TRANSGENIC WINTER TRITICALE (X TRITICOSECALE WITTMACK). *BMC PLANT BIOLOGY*, 12(1), 1.
- HIDENO, A., H. INOUE, T. YANAGIDA, K. TSUKAHARA, T. ENDO, and S. SAWAYAMA. 2012. Bioresource Technology Combination of hot compressed water treatment and wet disk milling for high sugar recovery yield in enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology* 104: 743–748..
- HSIAO, T. C. 1973. PLANT RESPONSES TO WATER STRESS. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY*, 24(1), 519-570.
- IMAMURA, T., A. HIGUCHI, and H. TAKAHASHI. 2013. Plant Science Dehydrins are highly

- expressed in overwintering buds and enhance drought and freezing tolerance in *Gentiana triflora*. *Plant Science* 213: 55–66.
- INGRAM, J., and D. BARTELS. 1996. the Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377–403.
- JANMOHAMMADI, M., L. ZOLLA, and S. RINALDUCCI. 2015. Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *PHYTOCHEMISTRY* 117: 76–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.003>.
- JIN, T. C., CHANG, Q., LI, W. F., YIN, D. X., LI, Z. J., WANG, D. L., LIU, B., LIU, L. X. 2010. Stress-inducible expression of GmDREB1 conferred salt tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100(2):219–227.
- KOHLI, A., MIRO, B., & TWYMAN, R. M. 2010. TRANSGENE INTEGRATION, EXPRESSION AND STABILITY IN PLANTS: STRATEGIES FOR IMPROVEMENTS. IN *TRANSGENIC CROP PLANTS* (PP. 201-237). SPRINGER BERLIN HEIDELBERG.
- LATA, C., and M. PRASAD. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 4731–4748.
- LAWLOR, D.W. 2013. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of Experimental Botany* 64: 83–108.
- LAWLOR, D.W., and G. CORNIC. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated PHOTOSYNTHESIS UNDER. *Regulation* 44: 275–294. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x/full>.
- LEAL-BERTIOLI, S.C.M., D.J. BERTIOLI, P.M. GUIMARÃES, T.D. PEREIRA, I. GALHARDO, J.P. SILVA, A.C.M. BRASILEIRO, ET AL. 2012. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany* 84: 17–24. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847212000925>.
- LI, F., Y. HAN, Y. FENG, S. XING, M. ZHAO, Y. CHEN, and W. WANG. 2013. Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology* 163: 281–291. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.008>.
- LI, S. J., BAI, Y. C., LI, C. L., YAO, H. P., CHEN, H., ZHAO, H. X., & WU, Q. 2015. ANTHOCYANINS ACCUMULATE IN TARTARY BUCKWHEAT (*FAGOPYRUM TATARICUM*) SPROUT IN RESPONSE TO COLD STRESS. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM*,37(8), 1-8.
- LINDEMOSE, S., O'SHEA, C., JENSEN, M., SKRIVER, K. 2013. Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *Int J Mol Sci* 14:5842–5878.
- MASSONNET, C., DAUZAT, M., BÉDIÉE, A., VILE, D., & GRANIER, C. 2015. INDIVIDUAL LEAF AREA OF EARLY FLOWERING ARABIDOPSIS GENOTYPES IS MORE AFFECTED BY DROUGHT THAN LATE FLOWERING ONES: A MULTI-SCALE ANALYSIS IN 35 GENETICALLY MODIFIED LINES. *AMERICAN JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, 6(07), 955.
- MEINKE, D., J. CHERRY, and C. DEAN. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662–682.
- MENG, X., B. YIN, H.L. FENG, S. ZHANG, X.Q. LIANG, and Q.W. MENG. 2014. Overexpression of R2R3-MYB gene leads to accumulation of anthocyanin and enhanced resistance to chilling and oxidative stress. *Biologia Plantarum* 58: 121–130.
- MUNNS, R., and R.E. SHARP. 1993. Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 425–437.
- NAKASHIMA, K., FUJITA, Y., KANAMORI, N., KATAGIRI, T., UMEZAWA, T., KIDOKORO, S., MARUYAMA, K., YOSHIDA, T., ISHIYAMA, K., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2009. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* 50:1345–1363.
- NISHIZAWA, A., Y. YABUTA, and S. SHIGEOKA. 2008. Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiology* 147: 1251–1263.
- NOVAK, A., C. GUO, W. YANG, A. NAGY, and C.G. LOBE. 2000. Z/EG, a double reporter mouse

line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28: 147–155.

- PARK, Y. S., BAE, D. W., & RYU, C. M. 2015. Aboveground Whitefly Infestation Modulates Transcriptional Levels of Anthocyanin Biosynthesis and Jasmonic Acid Signaling-Related Genes and Augments the Cope with Drought Stress of Maize. *PLoS one*, 10(12), e0143879.
- PATIL, A.S., and B. SUJIT KUMAR. 2014. Dehydrin and its Role in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Popular Kheti* 2: 105–108.
- PIMENTEL, C. 2004. A relação da planta com a água. *Seropédica: Edur*.
- PUHAKAINEN, T., M.W. HESS, P. MA, J. SVENSSON, P. HEINO, and E.T. PALVA. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. 743–753.
- QIN, F., KAKIMOTO, M., SAKUMA, Y., MARUYAMA, K., OSAKABE, Y., TRAN, L. S., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2007. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in Zea mays L. *Plant J* 50:54–69
- RIBEIRO, R., B. ANDRADE, D. BRITO, P. KELLY, M. THEREZA, B. MARTINS, J. CARLOS, ET AL. 2014. Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant Science* 221-222: 59–68.
- RICROCH, A. E., J.B. BERGE, and M. KUNTZ. 2011. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. *Plant Physiology* 155: 1752–1761..
- ROBERTS, J.K., N. A. DESIMONE, W.L. LINGLE, and L. DURE. 1993. Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *The Plant cell* 5: 769–780.
- RORAT, T. 2006. Plant dehydrins--tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters* 11: 536–56.
- RUIJTER, N. C. A., VERHEES, J., LEEUWEN, W., & KROL, A. D. 2003. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biology*, 5(2), 103-115.
- SAIBI, W., K. FEKI, R. BEN MAHMOUD, and F. BRINI. 2015. Durum wheat dehydrin (DHN-5) confers salinity tolerance to transgenic Arabidopsis plants through the regulation of proline metabolism and ROS scavenging system. *Planta* 242: 1187–1194.
- SENGUPTA, S., and A.L. MAJUMDER. 2015. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–11.
- SHAO, X., ZHU, Y., CAO, S., WANG, H., & SONG, Y. 2013. Soluble sugar content and metabolism as related to the heat-induced chilling tolerance of loquat fruit during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3490-3498.
- SHARP, R.E. 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55: 2343–2351.
- SINGH, D., HAICOUR, R., SIHACHAKR, D., & RAJAM, M. V. 2015. Expression of rice chitinase gene in transgenic eggplant confers resistance to fungal wilts. *Indian Journal of Biotechnology*, 14, 233-240.
- SU, L., L. XU, Y. CHEN, and L. LI. 2012. Isolation of AhDHNs from Arachis hypogaea L. and evaluation of AhDHNs expression under exogenous abscisic acid (ABA) and water stress. *African Journal of Biotechnology* 11: 11221–11229.
- TAJI, T., C. OHSUMI, S. IUCHI, M. SEKI, M. KASUGA, and M. KOBAYASHI. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 29: 417–426.
- TAKANO, M., EGAWA, H., IKEDA, J. E., & WAKASA, K. 1997. The structures of integration sites in transgenic rice. *The Plant Journal*, 11(3), 353-361..
- TAMURA, K., KAWABAYASHI, T., SHIKANAI, T., & HARA-NISHIMURA, I. 2016. Decreased Expression of

- a Gene Caused by a T-DNA Insertion in an Adjacent Gene in Arabidopsis. *PLoS one*, 11(2), e0147911.
- TATTINI, M., C. GALARDI, P. PINELLI, R. MASSAI, D. REMORINI, and G. AGATI. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547–561.
- TIMOTHY, J. 1996. Dehydrins : Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. 795–803.
- TREUTTER, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147-157.
- Vinocur, B., and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress : achievements and limitations. 123–132.
- Xu-Gang, L., Song-Biao, C., Zi-Xian, L., Tuan-Jie, C., Qian-Chun, Z., & Zhen, Z. 2002. Impact of copy number on transgene expression in tobacco. *Acta Bot Sin*, 44, 120-123.
- VAN OOSTEN, M.J., A. SHARKHUU, G. BATELLI, R.A. BRESSAN, and A. MAGGIO. 2013. The Arabidopsis thaliana mutant air1 implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Molecular Biology* 83: 405–415.
- Vinocur, B., & Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- WANG, Y., WANG, H., LI, R., MA, Y., & WEI, J. 2013. Expression of a SK2-type dehydrin gene from *Populus euphratica* in a *Populus tremulax* *Populus alba* hybrid increased drought tolerance. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9225-9232.
- WILKINSON, S., and W.J. DAVIES. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33: 510–525.
- WISE, M.J., and A. TUNNAcliffe. 2004. POPP the question: What do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9: 13–17.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., and K. SHINOZAKI. 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses.
- YANG, H., J. NAIRN, and P. OZIAS-AKINS. 2003. Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology* 160: 945–52.
- YAO, X., W. XIONG, T. YE, and Y. WU. 2012. Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 63: 2579–2593.

12. APÊNDICES

Tabela 1. Etapas do processo de seleção de plantas transgênicas. A primeira coluna são os eventos obtidos em T0 (1 a 56). A segunda coluna são as linhagens na geração T1 que cada evento T0 deu origem. A terceira coluna são os eventos obtidos em homozigose (não-s segregantes). As células sombreadas significam evento/linhagem que não seguiram para as próximas gerações ou linhagem T2 (terceira coluna) que não foi obtida linhagem em homozigose.

Evento T0 (ID Planta)	Linhagem T1 (ID Planta)	Linhagem T2 em homozigose (ID Planta)
E 1		
E 2	2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6	2.1
E 3		
E 4		
E 5	5.1 e 5.2	
E 6	6.1	
E 7	7.1	
E 8	8.1	
E 9	9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7 e 9.8	9.2
E 10		
E 11	4.1, 4.2, 4.3 e 4.4	11.3
E 12		
E 13		
E 14		
E 15	15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5, 15.6 e 15.7	15.2 e 15.3
E 16		
E 17		
E 18	18.1, 18.2, 18.3, 18.4 e 18.5	18.3
E 19	19.1, 19.2, 19.3, 19.4, 19.5 e 19.6	
E 20	2.1	
E 21		
E 22		
E 23		
E 24	24.1, 24.2, 24.3, 24.4, 24.5 e 24.6	24.7
E 25	25.1, 25.2, 25.3, 25.4, 25.5, 25.6, 25.7, 25.8, 25.9, 25.10, 25.11, 25.12, 25.13, 25.14 e 25.15	25.8 e 25.15
E 26		
E 27	27.1, 27.2, 27.3, 27.4 e 27.5	
E 28	28.1, 28.2, 28.3, 28.4, 28.5 e 28.6	
E 29	29.1, 29.2, 29.3 e 29.4	29.2
E 30	30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7 e 30.8	30.4 e 30.5
E 31	31.1, 31.2, 31.3, 31.4, 31.5, 31.6, 31.7, 31.8 e 31.9	
E 32	3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8	32.4 e 32.5
E 33		
E 34		
E 35		
E 36	36.1, 36.2, 36.3, 36.4, 36.5, 36.6, 36.7, 36.8, 36.9, 36.10, 36.11 e 36.12	36.7
E 37	37.1, 37.2, 37.3 e 37.4	

E 38	38.1 e 38.2	
E 39	39.1 e 39.2	
E 40	40.1, 40.2, 40.3, 40.4 e 40.5	40.2 e 40.7
E 41	41.1, 41.2, 41.3, 41.4, 41.5, 41.6, 41.7, 41.8, 41.9, 41.10 e 41.11	
E 42	42.1, 42.2, 42.3, 42.4, 42.5, 42.6, 42.7, 42.8, 42.9, 42.10, 42.11 e 42.12	42.8 e 42.9
E 43	43.1, 43.2, 43.3 e 44.4	43.4
E 44	44.1, 44.2, 44.3, 44.4, 44.5, 44.6, 44.7 e 44.8	44.2
E 45		
E 46		
E 47		
E 48		
E 49		
E 50		
E 51		
E 52		
E 53		
E 54		
E 55		
E 56		