



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**OBTENÇÃO DE PLANTAS DE SOJA TRANSFORMADAS  
COM O GENE *QUA-QUINE STARCH* SOB REGULAÇÃO  
DO PROMOTOR DA  $\beta$ -CONGLICININA**

**AUTOR: Adriano Caiado Acioli Fernandes de Almeida.**

**ORIENTADOR: Dr. Elíbio Leopoldo Rech.**

**Brasília – DF**

**2018**

**ADRIANO CAIADO ACIOLI FERNANDES DE ALMEIDA**

OBTENÇÃO DE PLANTAS DE SOJA TRANSFORMADAS COM O *GENE QUAI-  
QUINE STARCH* SOB REGULAÇÃO DO PROMOTOR DA  $\beta$ -CONGLICININA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Elíbio Leopoldo Rech

**Brasília**

**2018**

À minha vó Nelúzia, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Elíbio Rech, pelos preciosos conselhos e ensinamentos ao longo dos últimos anos.

À Dra. Leila Barros, pelo apoio, amizade e incomensurável contribuição a este trabalho.

Ao Dr. Giovanni Vianna, à Jéssica Carrijo e à Lilian Hasegawa pela valiosa assistência na realização dos experimentos.

À Mayna, e às demais colegas do Laboratório de Biologia Sintética da EMBRAPA Cenargen.

À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, à EMBRAPA Cenargen e à agência de fomento CNPq, pelo apoio e oportunidade de desenvolver este projeto.

Aos familiares, amigos e todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização do presente trabalho.

## ABSTRACT

The *Qua-Quine Starch* orphan gene (*QQS*) is found exclusively in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The *QQS* protein, characterized by its interaction with transcriptional factors, acts in order to accentuate deviation in the metabolic flow of carbon and nitrogen, increasing protein and decreasing starch levels. In previous studies, soybean, rice and corn plants transformed with the *QQS* gene under constitutive promoter showed protein increased in all plant tissues. In this context, the current work aimed to obtain soybean plants transformed with the *QQS* gene under the regulation of the seed-specific  $\beta$ -conglycinin promoter in order to direct its expression exclusively in seeds, as a way of minimizing possible energy imbalances that may be caused by the presence of this transgene in other plant tissues. The transformation vector was constructed by replacing the Cyanovirin gene (*CVN*), present in the p $\beta$ CongCVN vector, by the *QQS* gene. The resulting plasmid, p $\beta$ CongQQS, together with the vector pAC321, which contains a gene that confers resistance to the selection agent imazapyr, was employed in the co-transformation of soybean zygotic embryos using a biolistic method. The bombardments resulted in three plants whose presence of the *QQS* gene was confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Southern Blot experiments. However, the same detection analyzes did not confirm the presence of the transgene in the progeny of these transgenic plants, a phenomenon that may be related to several molecular processes which are discussed in this work.

**KEY WORDS:** orphan genes; *QQS*; *Arabidopsis thaliana*; soybean;

## RESUMO

O gene órfão Qua-Quine Starch (*QQS*) é encontrado exclusivamente no genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. A proteína *QQS*, caracterizada pela sua interação com fatores transcricionais, atua de maneira a acentuar o desvio do fluxo metabólico de carbono e nitrogênio para a produção de proteínas ao invés de açúcares de reserva. Em estudos prévios, plantas de soja, arroz e milho transformadas com o gene *QQS* sob regulação de promotor constitutivo apresentaram aumento proteico em todos os seus tecidos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de plantas de soja transformadas com o gene *QQS* sob a regulação do promotor da  $\beta$ -conglucina, específico de semente, de maneira a direcionar sua expressão exclusivamente às sementes, como forma de minimizar possíveis desequilíbrios energéticos causados pela introdução deste transgene nos demais tecidos vegetais. O vetor de transformação foi construído pela substituição do gene da Cianovirina (*CVN*), presente no vetor p $\beta$ CongCVN, pelo gene *QQS*. O plasmídeo resultante, p $\beta$ CongQQS, juntamente com o vetor pAC321, o qual contém o gene de resistência ao agente de seleção imazapyr, foi utilizado na co-transformação de embriões zigóticos de soja, por meio do método biobalístico. Os bombardeamentos realizados resultaram na obtenção de três plantas cuja presença do gene *QQS* foi confirmada por experimentos de Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*) e *Southern Blot*. Contudo, as mesmas análises de detecção não confirmaram a presença do transgene na progênie destas plantas transgênicas, fenômeno que pode estar relacionado a uma série de processos moleculares os quais são discutidos nesta dissertação.

**PALAVRAS-CHAVE:** genes órfãos; *QQS*; *Arabidopsis thaliana*; soja;

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Vizinhança cromossomal do gene *QQS*.

**Figura 2** – Mudanças metabólicas induzidas pela expressão do gene *QQS*.

**Figura 3** – Acelerador de partículas com alta pressão de gás hélio

**Figura 4** – Representação esquemática do vetor comercial, pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS.

**Figura 5** – Representação esquemática do vetor p $\beta$ congCVN.

**Figura 6** – Representação esquemática do vetor pAC321.

**Figura 7** – Gel de agarose referente à digestão enzimática dos vetores pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS e p $\beta$ CongQQS.

**Figura 8** – Gel de agarose referente à confirmação da construção do vetor p $\beta$ CongQQS.

**Figura 9** – Representação esquemática do vetor p $\beta$ CongQQS construído

**Figura 10** – Análise de PCR de plantas ( $T_0$ ) de soja cv. BRS 7980 co-bombardeadas com o vetor p $\beta$ CongQQS e o vetor pAC321

**Figura 11** – Resultado do experimento de *Southern blot* com o DNA de plantas de soja PCR positivas digerido com a enzima XhoI.

**Figura 12** – Análise de PCR de plantas ( $T_1$ ) quanto à presença do gene da actina endógena (*ACT1*) em seus extratos genômicos foliares.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 A CULTURA DA SOJA (<i>Glycine max</i>)</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 A planta .....	12
2.1.2 Importância Econômica .....	14
2.1.3 Melhoramento Genético .....	16
<b>2.2 O GENE <i>Qua-Quine Starch (QQS)</i></b> .....	<b>18</b>
2.2.1 O gene.....	18
2.2.2 Função Regulatória.....	19
2.2.3 Aplicações Biotecnológicas .....	21
<b>2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS</b> .....	<b>22</b>
2.3.1 Visão geral da transformação genética de plantas .....	22
2.3.2 Transformação direta pelo sistema biobalístico .....	22
2.3.3 O método de seleção por co-transformação .....	24
<b>3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 Construção do vetor p<math>\beta</math>CongQQS</b> .....	<b>27</b>
5.1.1 Amplificação do vetor plasmidial pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS.....	28
5.1.2 Clonagem do gene <i>QQS</i> no vetor de bombardeamento p $\beta$ CongCVN.....	28
<b>5.2 Transformação genética de <i>Glycine max</i> com o vetor p<math>\beta</math>CongQQS</b> .....	<b>30</b>
5.2.1 Preparo do material vegetal.....	30
5.2.2 Preparo das micropartículas para bombardeio.....	30
5.2.3 Bombardeamento .....	31
<b>5.3 Seleção, cultivo e aclimação das plântulas bombardeadas</b> .....	<b>32</b>
<b>5.4 Análise das plantas transformadas</b> .....	<b>33</b>
5.4.1 Extração de DNA genômico.....	33
5.4.2 Verificação de plantas positivas por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
5.4.3 Detecção do fragmento por <i>Southern blot</i> .....	34
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6.1 Construção do vetor plasmidial p<math>\beta</math>CongQQS</b> .....	<b>37</b>
<b>6.2 Transformação genética de <i>Glycine max</i> com o vetor p<math>\beta</math>CongQQS</b> .....	<b>40</b>

6.2.1 Detecção do gene <i>QQS</i> por <i>Southern Blot</i> .....	41
6.2.2 Análise da progênie de plantas transgênicas para o gene <i>QQS</i> .....	42
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A vida, como a conhecemos, encontra-se unificada pela universalidade do código genético. Na figura da molécula de DNA, todos os organismos vivos utilizam-se dos mesmos blocos de construção para a edificação gênica e conseqüente composição de sua biologia. Em consonância a esta asserção, as imensuráveis possibilidades de organização do DNA são as responsáveis pela segregação destes mesmos organismos em espécies. Diferentes espécies, apesar de conservarem certas informações biológicas entre si, possuem diferentes genomas e, por conseguinte, diferentes organizações gênicas. Isto é ratificado na existência de genes espécie-exclusivos – também denominados genes órfãos – os quais compõem cerca de 2% a 8% do genoma de essencialmente todas as espécies sequenciadas até o momento (Li e Wurtele, 2015). Estes genes órfãos recebem tal denominação pois carecem de homologia a quaisquer outros genes catalogados, permanecendo nativamente restritos à espécie em que são encontrados (Prabh e Rödelsperger, 2016). A função celular da maior parte destes genes ainda não está elucidada, mas há crescente evidência a respeito do papel regulatório que desempenham sobre a capacidade adaptativa das espécies (Gollery *et al.*, 2006; Tautz e Domazet-Lozo, 2011; Wissler *et al.*, 2013).

Descrito por Silveira *et al.* (2013) como tendo surgido de novo a partir de sequências ricas em elementos de transposição durante a cladogênese da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, o gene *QQS* é encontrado somente no contexto genômico desta espécie, ausentando-se de homólogos detectáveis e sequências semelhantes nos demais organismos já sequenciados (Li *et al.*, 2015). Este gene órfão – o qual codifica para um polipeptídeo homônimo de 59 aminoácidos – é caracterizado pelo seu papel na modulação e alocação de carbono e nitrogênio na planta, e apresenta expressão diferencial em variadas condições de stress abiótico (Li *et al.*, 2009; Donoghue *et al.*, 2011). O mecanismo regulatório em questão baseia-se na interação da proteína *QQS* com a subunidade C4 do fator de transcrição nuclear Y (NF-Y C4) (Li *et al.*, 2015). O aumento na expressão de NF-YC4 mimetiza os efeitos de aumento na expressão de *QQS*. Em confluência a esta dinâmica de ligação, a indução da expressão reduzida de *QQS* em *A. thaliana* foi demonstrada como resultando em um aumento de até 30% do conteúdo de amido foliar e um correspondente decréscimo de até 7% na concentração proteica nestes mesmos tecidos, enquanto que a superexpressão deste gene órfão forneceu efeito inverso,

decrecendo a quantidade de amido a cerca de 23% e aumentando a de proteína em até 3% (Li *et al.*, 2009; Li e Wurtele, 2015). Ademais, a relativa conservação evolutiva da molécula alvo NF-YC4 em eucariotos permitiu que testes similares fossem realizados em milho, arroz e soja, experimentos os quais reafirmaram o efeito ativo do *QQS* sobre a priorização e desvio do fluxo de carbono derivado da fotossíntese para a produção de proteínas em detrimento de carboidratos de reserva (Li *et al.*, 2015).

O elevado teor proteico e a versatilidade de aplicações para a indústria alimentícia fazem da soja uma das mais importantes oleaginosas cultivadas em âmbito mundial, e a principal fonte de proteína vegetal para alimentação humana e animal (Sgarbieri, 1996). Em meio a esta prerrogativa, segundo Carroll (1992), o grão da soja tem exibido crescente ascensão econômica devido não só à quantidade, mas também à qualidade das proteínas armazenadas na semente, elencando-a o melhor substituto para produtos proteicos de origem animal (Ferreira, 2008). De forma expressiva, a soja configura um produto fundamental na pauta exportadora brasileira (Silva *et al.*, 2010). A  $\beta$ -conglucina e a glicina são as proteínas mais abundantemente acumuladas nos vacúolos de armazenamento proteico (em inglês “*protein storage vacuole*”- PSV) das sementes de soja, compondo – em linhagens naturais – cerca de 70% da concentração polipeptídica nesses compartimentos (Yaklich, 2001). Sequências regulatórias tecido específicas encontradas na subunidade  $\alpha'$  do promotor da  $\beta$ -conglucina e peptídeo sinal da proteína têm demonstrado eficácia em acumular diferentes tipos proteicos nos PSV (Kim e Krishnan, 2004; Yamada *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2011; O'keefe *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho – sob a relevância econômica da proteína de soja para o mercado nacional – objetiva a obtenção de plantas de soja transformadas com o gene *QQS* de *A. thaliana* sob regulação da subunidade  $\alpha'$  do promotor semente específico da  $\beta$ -conglucina ( $\beta$ cong), e respectivo peptídeo sinal, para que este gene, por sua vez, leve à maximização da concentração de proteínas armazenadas nos tecidos das sementes destes vegetais transgênicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CULTURA DA SOJA (*Glycine max*)

#### 2.1.1 A planta

A soja (*Glycine max*), sob o escopo taxonômico das plantas herbáceas da tribo Phaseolae, pertence à família Fabaceae e subfamília Papilionoideae (Ramos *et al.*, 2017). O gênero *Glycine* é composto por 25 espécies, sendo a maioria espécies selvagens perenes (Hymowitz e Newell, 1980; Hartman *et al.*, 2000; Bonato e Bonato, 1987).

A planta de soja é uma espécie autógama e diploide ( $n = 40$ ) de germinação epígea com seus diferentes estágios de maturação, desde a germinação até o florescimento e posterior desenvolvimento do grão, bem caracterizados. Suas sementes ovais consistem de um embrião largo – composto pela radícula e dois cotilédones – enclausurado por uma fina camada tegumentar cuja coloração em variedades comerciais é majoritariamente amarela. Quando da germinação, a emergência da plântula pode ocorrer por hábito de crescimento determinado ou indeterminado para dar origem a um hipocótilo e a uma plúmula com duas folhas unifoliatas, articuladas no vértice do pecíolo. Subsequentemente ao surgimento do primeiro par de folhas, após a expansão e desdobramento do cotilédone, desenvolvem-se no caule, de maneira alternada e periódica, os nós foliares superiores trifoliados. Durante o amadurecimento, a planta pode chegar a cerca de um metro de altura e passa a florescer na medida em que seu fotoperíodo é reduzido abaixo de um valor crítico. Dependendo do cultivar em questão, as flores podem ser brancas ou arroxeadas. Após a abertura floral, a vagem (fruto) alonga-se de forma que suas sementes (grãos), em torno de três, desenvolvam-se. A duração do ciclo de maturação, fenologia, crescimento, desenvolvimento e produtividade da planta de soja fundamenta-se na adaptabilidade da variedade à estação de crescimento e à respectiva região em que está inserida (Hanway *et al.*, 1967; Hartman *et al.*, 2000; Oliveira, 2010; Purcell *et al.*, 2014).

Considerada uma das espécies mais antigas cultivadas pelo homem, a soja registra sua inserção na história da agricultura humana há mais de 4000 anos, no leste asiático. Inicialmente lavrada na região chinesa, esta leguminosa teve seu cultivo longevamente difundido pela Ásia antes de ser assimilada por comunidades europeias no século 17, cujo

acesso resultou posteriormente em sua introdução no continente americano. No Brasil, o cultivo da soja foi preliminarmente implementado no estado Baiano por Gustavo D'utra em 1882, concomitantemente ao despertar de interesse de produtores argentinos e estadunidenses pelo potencial agrônômico desta leguminosa. Atualmente, a agricultura da planta – amplamente conduzida nos continentes asiático, americano e africano – configura alta relevância econômica para o agronegócio chinês, indiano, argentino, brasileiro e estadunidense. Esta leguminosa – a principal *comodity* oleaginosa cultivada no Brasil – contribui fortemente para o superávit da balança comercial nacional (Bonato e Bonato, 1987).

A composição majoritariamente proteoleica do grão da planta de soja possui implicações diretas sobre o seu valor nutricional e comercial. Em termos da organização de suas macromoléculas biológicas, os principais componentes da semente particionam-se em proteínas (35 a 45%), lipídeos (18 a 25%), carboidratos (30 a 34%) e minerais (5%), os quais variam em porcentagem de acordo com as condições de plantio, solo e variedade cultivada (Ferreira, 2008).

Corpúsculos contidos nas células cotiledonares são os principais centros de estocagem proteica na semente de soja. Estes invólucros lipídicos, denominados Vacúolos de Estocagem de Proteína (PSVs), consistem em organelas temporais localizadas no retículo endoplasmático responsáveis pelo acúmulo e armazenamento de uma extensa variedade de proteínas, as quais são agrupadas de acordo com seus coeficientes de sedimentação, 2S, 7S, 11S e 15S (Liu, 1997; Hong *et al.*, 2004). A fração 2S – delimitada principalmente por inibidores de tripsina – e a fração 15S, por globulinas 15S, somam juntas um terço da concentração total de proteínas na semente. Enquanto que a fração 7S – constituída por hemaglutininas, lipoxigenases, b-amilases e globulinas 7S – e a fração 11S, formada majoritariamente por globulinas 11S, são responsáveis pelos dois terços remanescentes (Wolf, 1974).

As globulinas 7S ( $\beta$ -conglucininas) e 11S (glicininas) totalizam cerca de 70% das proteínas armazenadas no grão de soja. Estes polipeptídios de estrutura multisubunitária e ação catalítica não evidenciada operam primariamente como reservas de carbono e nitrogênio para o processo de germinação da semente. A  $\beta$ -conglucininina particiona-se esquematicamente em três subunidades glicosiladas entre si de maneira assimétrica e de peso molecular aproximado:  $\alpha'$  (57-83 kDa),  $\alpha$  (57-76 kDa) – constituídas principalmente

pelo aminoácido cisteína – e  $\beta$  (42-53kDa), majoritariamente composta por aminoácidos leucina, glutamina, arginina e asparagina. A glicinina, de estrutura hexamérica e menos heterogênea, é em contrapartida, montada a partir de polipeptídios com um maior conteúdo de cisteína e metionina (Wolf, 1974; Badley *et al.*, 1975; Ferreira, 2008).

A qualidade nutricional proteica do grão da soja destaca-se na alimentação humana pela sua crescente aplicação em uma variedade de comidas, tais como farinhas, formulas infantis, queijo, tempê, tofu e substitutos vegetarianos à carne animal. Em contexto, efeitos benéficos do consumo da proteína de soja foram registrados na redução do colesterol plasmático, prevenção de câncer, diabetes, obesidade e proteção contra doenças intestinais e hepáticas (Liu *et al.*, 2000; Friedman e Brandon, 2001; Singh *et al.*, 2008). Convergentemente, a origem vegetal da proteína de soja, enquanto alternativa sustentável à proteína animal, faz da sua produção e consumo, práticas de menor impacto sobre os recursos naturais (Pimentel e Pimentel, 2003).

### **2.1.2 Importância Econômica**

A indústria mundial da soja predomina sobre o mercado de produção e consumo de oleaginosas (Silva *et al.*, 2011). Esta relevância agroindustrial é estatisticamente comprovada segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), para o qual a produção global de soja para a safra 2018/2019 segue estimada em 354,54 milhões de toneladas. No contexto do relatório, o Brasil – detendo 33% da produção mundial – passa a ser o maior produtor desta espécie, seguido dos Estados Unidos (32,85%) e Argentina (15,8%), os quais juntos são responsáveis por 81,65% da safra mundial de soja (USDA, 2018). Em conformação a uma política econômica embasada pela demanda de produtos cultivados para o comércio internacional, o Brasil mantém-se também como o maior exportador de soja em grãos do mundo, com uma atribuição de 44,68% de todas as exportações mundiais (Conab, 2018)

No Brasil, o cultivo da soja é realizado em variadas regiões, viabilizando diversos sistemas produtivos e fronteiras agrícolas. Neste contexto, segundo o Compêndio de estudos Conab para a produtividade da soja em 2017, os cinco maiores produtores estaduais deste cultivar foram, decrescentemente, o Mato Grosso (rendimento: 2,883 mil kg/ha), Paraná (rendimento: 2,579 mil kg/ha), o Rio Grande do Sul (rendimento: 1,847

mil kg/ha), Goiás (rendimento: 2,631 mil kg/ha) e Mato Grosso do Sul (rendimento: 2,378 mil kg/há), os quais juntos somam 77% da produção nacional desta oleaginosa (Conab, 2018).

Enquanto produto estratégico para o Brasil, sobre as divisas obtidas com a exportação nacional do complexo da soja (grãos, farelo e óleo) – o qual representa a principal *commodity* do agronegócio brasileiro – amonta-se uma receita estimada em aproximadamente US\$ 32,463 bilhões para 2018 (Abiove, 2018).

As aplicações dos subprodutos da soja partilham-se na indústria mundial entre produtos de consumo humano, ração animal e, mais recentemente, biodiesel (Goldsmith, 2008). Em contexto nacional, o alto teor proteico e qualidade Premium do grão e farelo da soja brasileira viabilizam sua inserção em mercados exigentes como o europeu e japonês. Em confluência, a produção de farelo proteico e do óleo de soja comestível também contribuem para a competitividade doméstica na produção de carnes, ovos e leite (Ramos *et al.*, 2017).

Vários são os fatores que afetam o potencial agrônomo da sojicultura, os quais podem ser delineados, em abrangência, por vertentes sócio-econômicas, agro-ecológicas, fitossanitárias e nutricionais. Tais variáveis, limitantes à obtenção de altas produtividades, orbitam – para além de questões operacionais de logística de produção e exportação – a disponibilidade hídrica, fotoperiodicidade, susceptibilidade do cultivar a infecções parasíticas, adaptabilidade a solos ácidos, resistência a doenças e insetos, e composição do grão.

A proteína armazenada é um fator chave na agregação de valor econômico e nutricional ao grão de soja. Enquanto principal fonte proteica vegetal em rações animais e produtos de consumo humano, cerca de 60% do valor de mercado do grão de soja vem da sua farinha proteica enquanto 40% é representado pelo seu óleo (Pettersson e Pontoppidan, 2013). Em termos de composição para entrada no mercado, o farelo de soja deve possuir um mínimo de 47,5% de proteína para ser devidamente processado em ração (Willis, 2003). Consequentemente, sementes de cultivares comerciais de soja normalmente contêm entre 38% e 42% de proteína em peso seco, valores abaixo de 41,5%, entretanto, são insuficientes para o processamento em farelo comercialmente viável (Patil *et al.*, 2017).

Segundo Patil (2017), apesar do alto consumo e demanda da proteína de soja na indústria alimentícia (e.g., tofu, leite de soja, edamame, broto de soja) correspondente ao seu valor dietético nutricional e benéficos à saúde humana, a soja ainda não pode ser considerada como fonte ideal de proteína devido à sua baixa concentração de aminoácidos metionina e cisteína, e alta concentração de oligossacarídeos e potássio. Neste contexto, o desenvolvimento de cultivares voltado para a acentuação do conteúdo proteico e aminoacídico do grão é de fundamental importância para agregar e aumentar o valor econômico em variedades comerciais desta oleaginosa.

### **2.1.3 Melhoramento Genético**

Historicamente, a fração de óleo armazenado e o rendimento das sementes (número de vagens por planta e sementes por vagem) foram por muito tempo os principais alvos de programas de melhoramento para se alavancar o desempenho produtivo na sojicultura (Kantolic *et al.*, 2013). Ciclos de cruzamento e seleção de linhagens de cultivares sob a modulação de condições ambientais que predominam durante o período de crescimento – tais como luminosidade, umidade, temperatura e fotoperíodo – compõe a pauta estratégica convencional para a seleção de genótipos que possuam uma ou mais características desejáveis. Mais recentemente, com o relativo aumento na qualidade de vida acompanhado pelo aumento no consumo de carnes animais e aumento na demanda por proteína para a formulação de rações, cerca de 65% do valor da semente de soja passou a ser atribuído à sua fração proteica, despertando o interesse produtivo voltado para este mercado (Yaklich, 2001).

A principal dificuldade em se elevar o conteúdo proteico no grão de soja se dá pela correlação negativa desta fração com a de óleo armazenado e o rendimento total de sementes (Kim *et al.*, 2016). Tal correlação refreia a comercialidade de linhagens com alto conteúdo proteico pois a soja é vendida na base de peso, e estas linhagens tendem a fornecer menos sementes e conter menor conteúdo de óleo (Yaklich, 2001). Em confluência, a produção e acúmulo de proteínas na semente de soja constitui um traço genético quantitativamente herdado modulado pela interação de uma variedade de genes e fatores transcricionais sob interferência circunstancial do ambiente, o que configura um

obstáculo prevalecente em programas de melhoramento genético voltados para este fim (Chaudhary *et al.*, 2015).

Atualmente, uma abordagem preponderante no desenvolvimento de cultivares de soja com maior concentração de proteínas em seus grãos consiste na montagem de estratégias de cruzamento baseadas na integração de dados genômicos. Tais metodologias voltam-se à investigação e integração de diversos dados de germoplasma seguidas de genotipagem e fenotipagem para a identificação de loci cromossômicos relacionados ao aumento de proteína armazenada na semente da soja. Por meio da bioinformática, de maneira sistemática, são construídos e analisados mapas genômicos baseados na associação de genomas altamente anotados para a planta de soja de forma a viabilizar a detecção de genes que contribuem para o acúmulo proteico no grão. A partir destes dados fenotípicos, são realizadas seleções de progênie e desenhos de cruzamento (Patil *et al.*, 2017).

Complementarmente a estratégias de cruzamento convencional, abordagens transgênicas voltadas para a acentuação do conteúdo proteico da semente de soja têm sido realizadas. Em pauta, encontra-se a introdução do gene órfão *QQS*, de *Arabidopsis thaliana*, na planta de soja para o direcionamento do particionamento metabólico de carbono e nitrogênio e conseqüente acentuação de seu conteúdo proteico total (Li *et al.*, 2015). Independentemente do background genético do cultivar de soja, o transgene em questão – expresso em linhagens de soja Williams 82 sob regulação do promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S nos diferentes tecidos vegetais – aumentou a concentração de proteína da semente em até 10%, reduzindo o nível de amido e mantendo inalterados a morfologia da planta, seu rendimento de grãos e sua fração de óleo armazenada.

## 2.2 O GENE *Qua-Quine Starch (QQS)*

### 2.2.1 O gene

O gene órfão *Qua-Quine Starch (QQS; At3g30720)* configura uma sequência gênica restrita e evolutivamente recente descoberta e caracterizada para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Supostamente originado de novo a partir de sequências não codificantes, genomicamente localizado em uma região rica em elementos transponíveis sob restrição cromossomal, e propenso a variações epigenéticas, este gene de curta extensão nucleotídica (177 pb) configura uma região aberta de leitura cujo produto proteico homônimo de 7 kDa e 59 aminoácidos não apresenta similaridade de sequência quando em comparação a demais proteínas ou peptídeos catalogados em bancos de dados. Em termos de imediação cromossômica, o gene *QQS* é cercado por sequências pseudogênicas semelhantes a transposons com homologia à família das transposases *CACTA-like* e a sequências de elementos retro transponíveis. Apesar da vigente alta densidade de metilação, hipotetiza-se que ancestralmente a possível intensa atividade de transposons na região possa ter contribuído para a evolução deste gene órfão (Li *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2013).

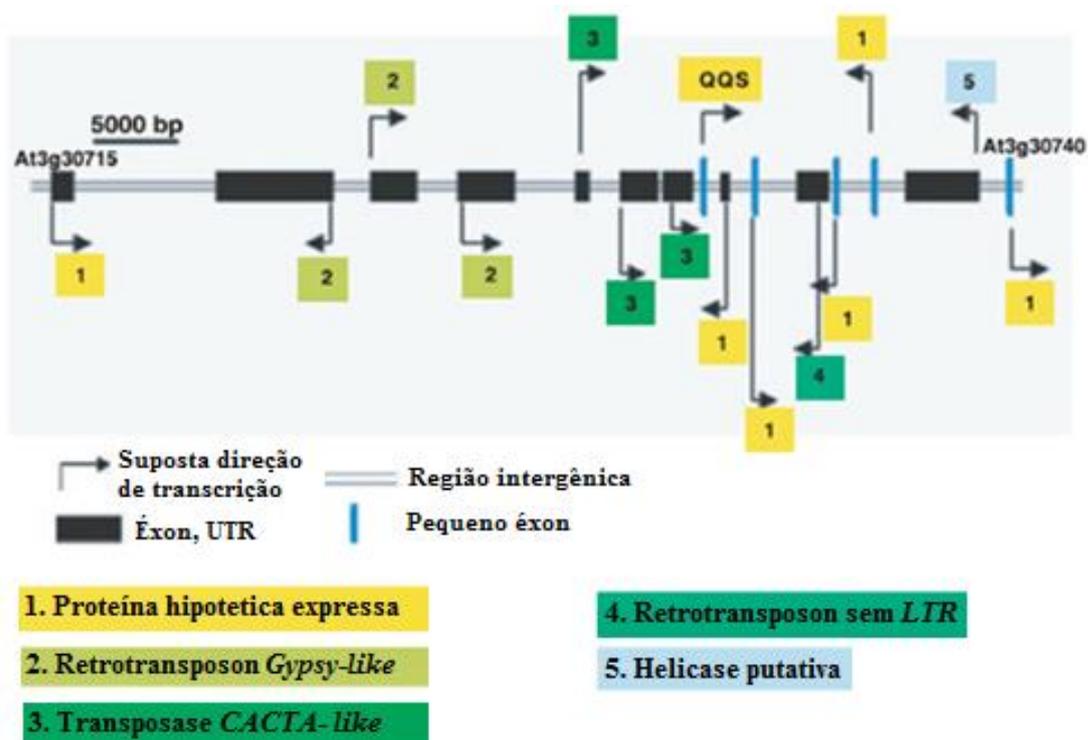


Figura 1. Vizinhança cromossomal do gene *QQS*. Em seus arredores este gene órfão é cercado por pequenas regiões abertas de leitura, sequências pseudogênicas e sequências similares a transposons (adaptado de Li *et al.*, 2009).

Na literatura, a proteína QQS – cujo transcrito precursor acumula-se em diferentes órgãos vegetais responsivo a variações ambientais – tem atividade amplamente descrita quanto à sua participação nos processos de regulação metabólica envolvendo o particionamento de carbono e nitrogênio para vias de síntese de proteínas e carboidratos de reserva nas sementes e folhas em *Arabidopsis thaliana* e espécies ectópicas transgênicas (Li *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Função Regulatória

A principal função atribuída ao gene *QQS* orbita o seu caráter modulador sobre vias metabólicas de alocação de nitrogênio e carbono. Enquanto primeiro gene órfão bioquimicamente caracterizado, este teve seu papel molecular inicialmente avaliado em *A. thaliana* por Li *et al.* (2009) a partir de experimentos de escaneamento genômico para a investigação de genes cuja expressão é alterada em mutantes *Atss3* e *mex1*, abundantes em amido armazenado. Neste contexto, com um padrão de acúmulo tecidual complexo sob diferentes condições ambientais, a transcrição do gene *QQS* em plantas *Atss3* mostrou-se suprarregulada quando em comparação a tipos selvagens. Sob convergência investigativa, via tecnologia do RNA interferente, aumentos de 20% a 30% na quantidade de amido foliar armazenado foram atribuídos à repressão da expressão do *QQS* em linhagens selvagens, indicando relação funcional inversa entre a expressão deste gene órfão e a taxa de biossíntese de amido. Em publicações complementares, estudos de expressão gênica subsequentes indicaram – para além de seu efeito documentado sobre o acúmulo de amido – a influência metabólica do gene *QQS* sobre o conteúdo proteico em *Arabidopsis* (Li e Wurtele, 2015; Li *et al.*, 2015).

Nesse contexto, de acordo com as principais linhas de evidência, a finalidade funcional do gene *QQS* é atribuída ao seu efeito inversamente proporcional perante o acúmulo de proteína e amido nos órgãos vegetais. Sob consequência metabólica inversa caso infrarregulado, este gene órfão, quando em atividade, tende a desviar o metabolismo da planta de forma que esta priorize recursos carbônicos e nitrogenados para vias de síntese e armazenamento de proteínas em detrimento de vias de acúmulo de açúcares de reserva (Li e Wurtele, 2015). O desencadeamento molecular proposto e elucidado para este evento por Li *et al.* (2015) alicerça-se na ligação citosólica da proteína QQS à

subunidade C4 do fator de transcrição nuclear Y (NF-YC4), e posterior alocação deste complexo proteico ao núcleo da célula. De acordo com o modelo proposto por Li, a mecanística molecular exata pela qual o complexo QQS-NF-YC4 altera a regulação transcricional nuclear direcionada a vias de alocação de carbono e nitrogênio permanece irresoluta.

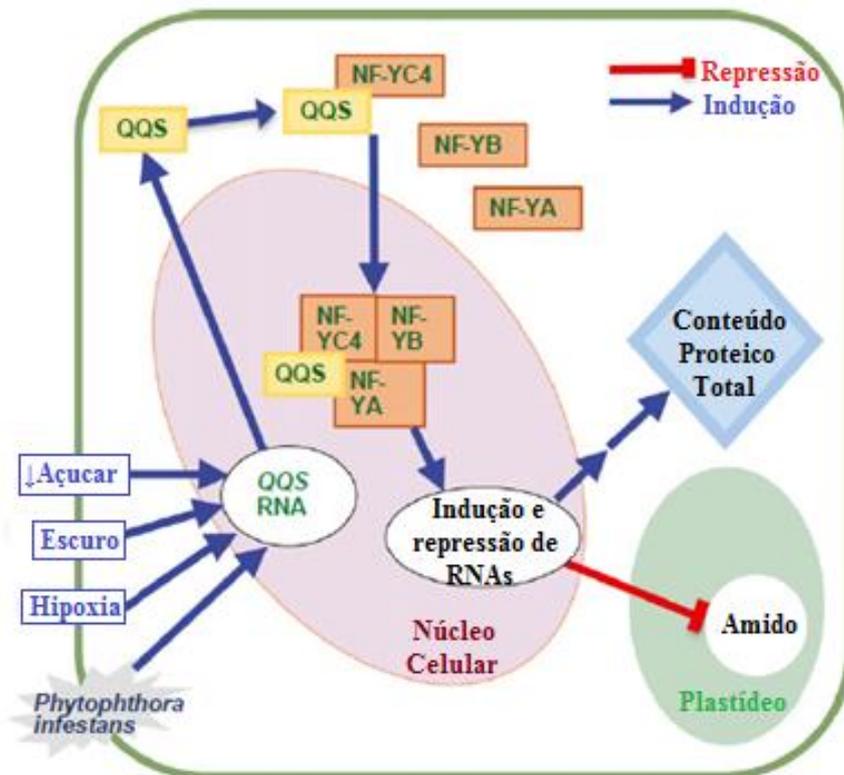


Figura 2. Modelo proposto para mudanças metabólicas induzidas pela expressão do gene *QQS* (adaptado de Li *et al.*, 2015).

Condições ambientais documentadas na indução de expressão para o gene *QQS* envolvem baixo fornecimento de carbono, exposição prolongada à escuridão e baixo provimento de oxigênio. Por simetria, a infrarregulação do gene *QQS* é provocada pela exposição vegetal a condições ambientais inversas às anteriormente citadas. Adicionalmente, a exposição a baixas temperaturas e a infecção por *Pseudomonas syringae* têm sido associadas como influenciando negativamente sobre cascatas moleculares relacionadas à transcrição do gene *QQS*, reduzindo a taxa de expressão deste gene (Arendsee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Aplicações Biotecnológicas

Apesar de incipientemente explorado, o potencial biotecnológico do gene órfão *QQS* tem sido recentemente evidenciado enquanto alternativa proeminente para a otimização da produtividade proteica em espécies vegetais de relevância agrônômica.

A partir da prerrogativa de que a atribuição de vantagens seletivas pela interação com proteínas previamente estabelecidas é o fator determinante para a fixação de genes órfãos no genoma de uma espécie, Li *et al.* (2015) investigaram em espécies de interesse agrônômico (soja, arroz e milho) os efeitos da expressão ectópica do gene *QQS*, cujo mecanismo de ação endógeno em *A. thaliana* é desencadeado pela complexação de seu produto proteico com o fator de transcrição nuclear NF-YC, conservado em espécies eucarióticas (Laloum *et al.*, 2013; Nardini *et al.*, 2013). Dentre os principais achados, a condução de experimentos de expressão do transgene *QQS* em soja, arroz e milho implicou no aumento de conteúdo proteico e concomitante redução no conteúdo de amido em folhas e sementes de linhagens transformadas, as quais não apresentaram distinções morfológicas nem taxas fotossintéticas reduzidas quando em comparação às suas respectivas linhagens selvagens controle (Li *et al.*, 2015).

Em maior aprofundamento, a expressão ectópica do gene *QQS* sob controle do promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S em linhagens de soja Williams 82 demonstrou-se capaz de acentuar o conteúdo proteico foliar em até 60% e reduzir, no mesmo tecido, os níveis de amido a cerca de um oitavo do encontrado em linhagens controle não transformadas. Convergentemente, dados de espectroscopia de ressonância magnética de sementes de linhagens transformadas atestaram aumentos de até 18% na concentração de proteínas armazenadas, sob desbalanceamentos reduzidos na fração de óleo acumulada quando em comparação a tipos selvagens correspondentes (Li e Wurtele, 2015).

## **2.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS**

### **2.3.1 Visão geral da transformação genética de plantas**

A transformação genética de vegetais viabiliza a introdução de sequências gênicas específicas no genoma de cultivares de interesse agrônomico. Enquanto ferramentas moleculares, as tecnologias de transformação nos permitem estudar a função e regulação de genes alvo, ou realizar a transferência dirigida de genes agronomicamente relevantes em programas de melhoramento, os quais seriam irrealizáveis através de práticas tradicionais de cruzamento sexual ou fusão genômica. De maneira geral, os requisitos para a condução de experimentos voltados para a obtenção de plantas geneticamente transformadas incluem a disponibilidade de um tecido alvo passível de regeneração ou multibrotação, uma metodologia para transferência de material genético, e uma plataforma de seleção e regeneração das plantas transformadas. Variadas, as principais abordagens metodológicas para a introdução de genes em vegetais baseiam-se na transferência indireta mediada por vetores bacterianos (*Agrobacterium tumefaciens* ou *A. Rhizogenes*) ou na transferência direta via sistemas biobalísticos alicerçados na aceleração de partículas incrustadas com material genético (Karesch *et al.*, 1991; Soares *et al.*, 2010; Glick, 2017)

### **2.3.2 Transformação direta pelo sistema biobalístico**

O método biobalístico fundamenta-se na introdução *in vivo* de moléculas de DNA em células vegetais através da complexação destas biomoléculas a microprojéteis acelerados a altas velocidades. Essencialmente, uma vez disparadas contra o tecido vegetal, estas partículas são capazes de atravessar os invólucros celulares de maneira não letal e se alojarem aleatoriamente no núcleo da célula, enquanto os fragmentos de biomoléculas exógenas introduzidas são então liberados tornando-se passíveis de integração cromossômica por processos de recombinação ilegítima ou homóloga mediados pela maquinaria endógena da célula receptora (Klein *et al.*, 1987; Sanford, 1988; Rech e Aragão, 1998; Homrich *et al.*, 2012). Considerado uma abordagem de transformação simples, rápida e versátil, a principal vantagem do sistema biobalístico configura a possibilidade de se transferir genes a quaisquer tipos celulares ou teciduais,

independentemente de condições genótípicas ou compatibilidade circunstancial entre hospedeiro e vetor de transferência, como não é o caso em sistemas de transformação vegetal mediados por *A. tumefaciens*. Convergentemente, qualquer tecido com potencial de regeneração é adequado para a transformação biobalística (Sartoretto *et al.*, 2008; Homrich *et al.*, 2012).

Sob parâmetros ajustáveis para otimização da eficiência de transformação em diferentes tipos celulares (figura 3), os microprogéteis de ouro ou tungstênio carregando o material genético de interesse são propelidos em uma câmara de bombardeamento – composta por uma tubulação conectora, fonte de vácuo, regulador de hélio, válvula solenoide e tubos conectivos – na qual o disparo é consequência da liberação de pressão de gás hélio pelo rompimento de um "disco de ruptura" e subsequente impulsionamento de um outro disco contendo as partículas e DNA precipitados, os quais disparam contra uma tela de amparo, pelas quais as micropartículas atravessam e colidem com as células. O diâmetro das partículas, de alta densidade e baixa reatividade química, em questão (0,2 $\mu$ - 0,4 $\mu$ m) varia em função do alvo celular (Aragao *et al.*, 1996; Lacorte, 1999; Rech *et al.*, 2008)

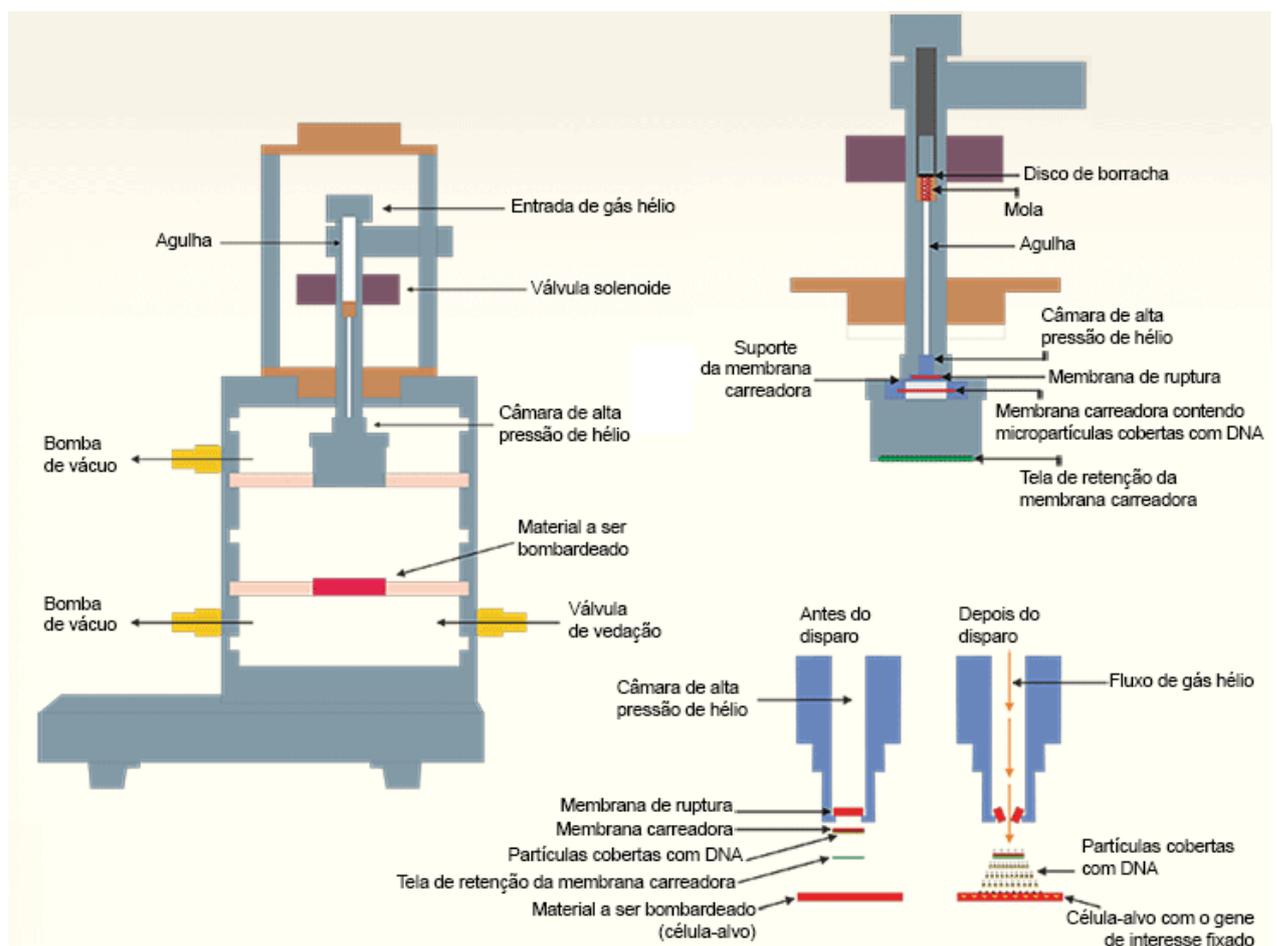


Figura 3. Representação esquemática do acelerador de partículas com alta pressão de gás hélio (Landgraf, 2015).

O estabelecimento de um programa de transformação otimizado é essencial para o sucesso no procedimento biobalístico. As principais variáveis a serem consideradas durante o emprego desta técnica englobam a construção do sistema genético a ser bombardeado, a calibração de parâmetros físicos relacionados ao aparelho, o ajuste de parâmetros relacionados aos microprojéteis e o estabelecimento da estratégia de cultura de tecidos para a regeneração dos tecidos biológicos bombardeados, assim como para o processo de seleção das plantas transformadas (Carneiro *et al.*, 2004).

### **2.3.3 O método de seleção por co-transformação**

O uso de genes marcadores em um programa de transformação vegetal objetiva a conferência de vantagens seletivas às células transformadas, de forma que estas possam triunfar e crescer concomitantemente ao extermínio de contrapartes não transformadas. Neste contexto, em uma abordagem de co-transformação, o gene de interesse é introduzido simultaneamente ao gene marcador, o que pode ser realizado com vetores distintos a serem conjuntamente introduzidos na célula alvo (Baungratz *et al.*, 2013; O'keefe *et al.*, 2015).

O sistema de co-transformação proporciona a segregação do gene de interesse e do gene de marcação na progênie de plantas transgênicas, deste que estes tenham sido inseridos em loci diferentes, não ligados. O que confere vantagem comercial a esta abordagem de transformação, visto à recomendação de que plantas transgênicas para consumo humano não devam carregar resquícios de sequências marcadoras – tais como as responsáveis por conferir resistência a antibióticos – devido à possibilidade da transferência horizontal destes transgenes à microbiota intestinal humana (Aragão *et al.*, 2000).

Quando mutado, o gene da acetolactato sintase (*ahas*) – pertencente à categoria dos genes marcadores de seleção utilizados em estudos de co-transformação – codifica para uma conformação alterada da enzima, a qual não é reconhecida por herbicidas da classe das imidazolinonas. Neste contexto, plantas transgênicas carregando o gene *ahas* mutado tornam-se resistentes a herbicidas tais como o imazapyr (Aragão *et al.*, 2000).

### 3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Esta dissertação investiga a hipótese de que é possível se obter, por técnica biobalística, plantas de soja transformadas com o gene *Qua-Quine Starch (QQS)* de *Arabidopsis thaliana* regulado pela subunidade  $\alpha'$  do promotor da  $\beta$ -conglucininina de soja.

A soja, uma commodity de grande impacto positivo na balança comercial brasileira, necessita de agregação de valor para diferentes mercados. Um dos mercados mais exigentes é o que utiliza essa leguminosa como fonte de proteínas tanto para consumo humano como animal. Desta forma, a acentuação do conteúdo proteico tem consequência imediata no valor econômico do produto. Além disso, o presente estudo tem grande potencial contributivo no entendimento dos mecanismos de atuação do gene *QQS*, bem como dos efeitos da sua expressão exclusiva nas sementes.

Neste contexto, como forma de contribuir para estudos relacionados ao efeito ectópico tecido específico de um gene órfão incipientemente estudado (*QQS*), e sob o escopo da agregação de valor econômico por meio da acentuação do conteúdo proteico armazenado no grão de variedades comerciais de soja, justifica-se o presente trabalho.

### 4. OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo geral a obtenção de plantas transgênicas de soja, transformadas com um gene exógeno (*QQS*, AT3G30720) sob o controle do promotor semente específico da subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucininina de soja.

#### 4.1 Objetivos Específicos

- Construção de um vetor plasmidial contendo o gene órfão de interesse (*QQS*) sob o controle da subunidade  $\alpha'$  do promotor gênico da  $\beta$ -conglucininina e respectivo peptídeo sinal da conglucininina.
- Co-transformação de embriões zigóticos de soja (*Glycine max*, cultivar BRS 7980) por biobalística com os vetores p $\beta$ CongQQS e pAC321,
- Cultivo dos embriões bombardeados em meio seletivo e transferência das plantas resultantes para o solo;

- Isolamento do DNA genômico das plantas regeneradas e análises por PCR e *Southern Blot* para verificação da presença do gene *QQS* nas mesmas.
- Cultivo das plantas em casa de vegetação até a obtenção das sementes T<sub>1</sub>;
- Plantio no solo das sementes T<sub>1</sub>, cultivo e análise do material genômico das plantas resultantes.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Construção do vetor p $\beta$ CongQQS

A construção do plasmídeo p $\beta$ CongQQS contendo o gene *QQS* sob regulação do promotor da  $\beta$ -conglícolina (p $\beta$ CongQQS), foi realizada pela amplificação e subsequente clonagem da sequência de 177pb correspondente ao gene *QQS* originário do vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS (EpochLifescience) – de maneira a substituir a região gênica da Cianovirina (*CVN*) no vetor de bombardeamento p $\beta$ CongCVN (O'Keefe *et al.* 2015), o qual contém a subunidade  $\alpha'$  do promotor da  $\beta$ -conglícolina e respectivo peptídeo sinal.

O gene *QQS* presente no vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS (EpochLifescience) (Fig. 4) foi sacado, via restrição enzimática, e clonado no vetor p $\beta$ CongCVN (Fig. 5) substituindo o gene *CVN* para a obtenção do vetor p $\beta$ CongQQS.

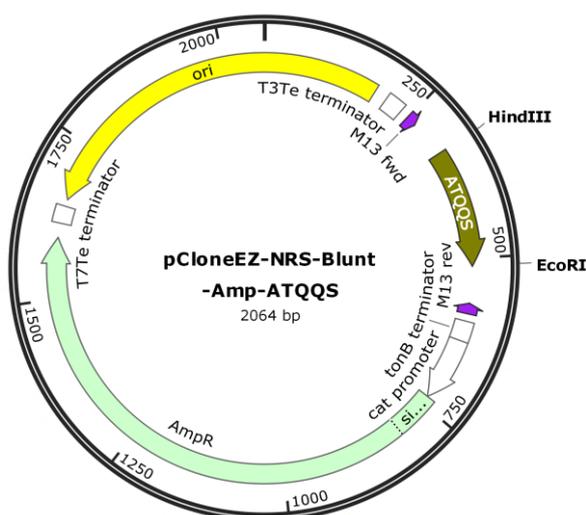


Figura 4. Representação esquemática do vetor, pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS. O qual contém gene de resistência a ampicilina e o gene *QQS* flanqueado pelos sítios de restrição HindIII e EcoRI.

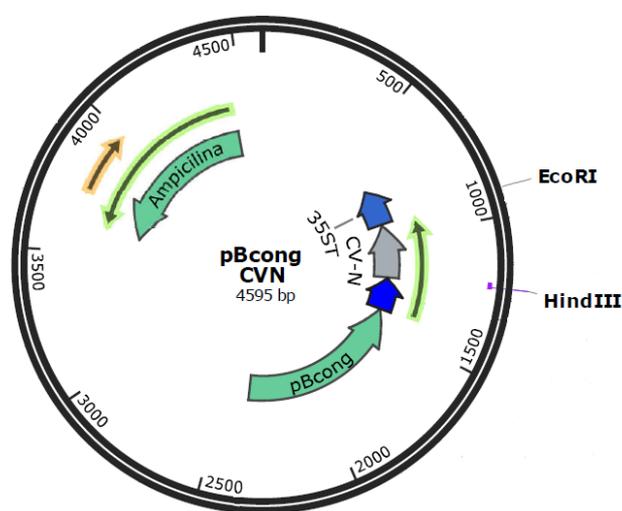


Figura 5. Representação esquemática do vetor, p $\beta$ congCVN. O qual contém gene de resistência a ampicilina e o gene *CVN* flanqueado pelos sítios de restrição EcoRI e HindIII (O'Keefe *et al.*, 2015).

### 5.1.1 Amplificação do vetor plasmidial pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS

Inicialmente, células competentes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* foram transformadas por choque térmico com o vetor comercial de resistência a ampicilina carregando o gene *QQS*, pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS (*EpochLifescience*), de acordo com o protocolado por Froger *et al.* (2007), para fins de amplificação. As amostras resultantes foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido acrescido de ampicilina (100 mg/ml) e colocadas em repouso por 24h a 37°C. Subsequentemente, duas colônias crescidas foram inoculadas separadamente em 3 ml de solução de inoculo – meio LB líquido (20 ml) acrescido de 20  $\mu$ l de ampicilina (100 mg/ml) – e deixadas para crescer sob aeração a 37°C por 8h a 150 rpm. Volumes (100  $\mu$ l) de cada cultura resultante foram então transferidos para 100mL de uma nova solução de inoculo e incubados a 37°C por 12h. O vetor de interesse foi posteriormente extraído das culturas via kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi Kit, conforme protocolado pelo fabricante. As duas amostras resultantes foram então quantificadas com respeito a suas concentrações de DNA em NanoDrop™ 2000/c Thermo Fisher Scientific (Amostra A: 1435 ng/ $\mu$ l; Amostra B: 521 ng/ $\mu$ l) e tiveram alíquotas de 2  $\mu$ g de DNA analisadas por eletroforese em gel de agarose após reação de digestão enzimática com enzimas EcoRI e HindIII (Invitrogen™), protocolada de acordo com o especificado pelo fabricante.

### 5.1.2 Clonagem do gene *QQS* no vetor de bombardeamento p $\beta$ CongCVN

Cedido pelo grupo do Dr. Giovanni R. Vianna (Embrapa, CENARGEN), o vetor p $\beta$ CongCVN (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) foi separado de seu fragmento de 306-bp correspondente à região codante do gene *CVN* de acordo com o protocolo de digestão anteriormente citado, para um volume final de reação igual a 100 $\mu$ l. O mesmo foi realizado para a retirada do gene *QQS* do vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS da amostra A obtida no capítulo 5.1.1 desta dissertação. Ambas as digestões resultantes foram então corridas em gel de agarose 2%.

De acordo com o kit e protocolo *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, foi realizada a recuperação e purificação das bandas referentes ao gene *QQS* e ao vetor aberto p $\beta$ Cong. Em convergência experimental, posteriormente à

quantificação da concentração de DNA nas amostras purificadas – *QQS* (8,5ng/μl) e pβCong (110ng/μl) – estas tiveram volumes de 2μl (vetor pβCong) e 3,5μl (fragmento *QQS*) utilizados em reação de ligação com o kit *Invitrogen™ ExpressLink™ T4 DNA Ligase*, de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante para um volume final de reação de 10μl.

A solução plasmidial resultante da conclusão da reação de ligação foi amplificada pela sua introdução em células competentes *DH5α* de *Escherichia coli* de acordo com o protocolo citado no capítulo 5.1.1 desta dissertação. Neste contexto, a análise do sucesso de ligação do gene *QQS* no vetor aberto pβCong e a confirmação da amplificação do constructo resultante, denominado pβCongQQS, foram feitas pela condução de um ensaio de restrição com enzimas *EcoRI* e *HindIII* de acordo com protocolo anteriormente descrito. Adicionalmente, para fins de confirmação adicional da clonagem, o vetor construído pβCongQQS foi sequenciado (*Macrogen, Inc.*).

## 5.2 Transformação genética de *Glycine max* com o vetor pβCongQQS

Os vetores pβCongQQS e pAC321 (fig. 6) foram co-bombardeados em uma razão de 1:1 sobre o meristema apical de hastes somáticas embrionárias de sementes de soja maduras, de acordo com o previamente descrito e protocolado por Aragão *et al.* (1996).

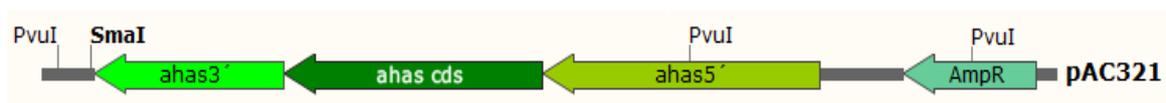


Figura 6. Representação esquemática do vetor pAC321. O qual contém o gene *ahas* sob controle do promotor *ahas* e respectivo terminador. O gene *Amp<sup>r</sup>* confere resistência a ampicilina (Vianna *et al.* 2011).

### 5.2.1 Preparo do material vegetal

Sementes maduras de soja cv. BRS 7980 foram desinfestadas em etanol 70% durante 1 minuto, e hipoclorito de sódio 1% durante 25 minutos. Em seguida, foram enxaguadas 5 vezes em água destilada estéril, posteriormente embebidas por 18h e deixadas a temperatura ambiente. Em fluxo laminar esterilizado, para exposição da região meristemática a ser bombardeada, as sementes desinfestadas tiveram seus cotilédones abertos, eixos embrionários retirados e folhas primárias cortadas.

Posicionados em placas de Petri contendo 12 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) – suplementado com 3% de agarose e 0,8% phytigel (Sigma), pH 5,7 – os eixos embrionários (10 eixos/placa) foram dispostos em círculos equidistantes entre 6mm a 12 mm do centro da placa, com a região meristemática apical apontada para cima.

### 5.2.2 Preparo das micropartículas para bombardeio

Inicialmente, 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 foram pesados, transferidos para tubo de microcentrifuga e acrescidos de 1 ml de etanol 70%. Após centrifugação por 15.000g por 5 minutos e remoção do sobrenadante resultante,

adicionou-se 1 ml de água destilada ao material precipitado e repetiu-se, nas mesmas especificações anteriores, o processo de centrifugação. O sobrenadante resultante foi descartado e a operação de lavagem repetidas mais duas vezes. Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, as micropartículas foram re-suspendidas em 1ml de glicerol 50% (v/v).

Em tubo de microcentrifuga adicionou-se sequencialmente – intercalando-se a rodadas de homogeneização – 50 µl da suspensão de micropartículas previamente homogeneizada, 5 µl de DNA plasmidial (1µg/µl), 50 µl de CaCl<sub>2</sub> (2,5 mol/L) e 20 µl de espermidina 0,1mol/L. Após incubação a temperatura ambiente sob agitação lenta por 10 minutos, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 g para a remoção do sobrenadante, subsequente adição de 150 µl de etanol absoluto e centrifugação a 15.000g durante 10 segundos. O sobrenadante resultante foi descartado e a etapa de centrifugação repetida sob as mesmas especificações anteriores. Após a adição de 24 µl de etanol absoluto ao tubo resultante, este foi sonicado durante 2 segundos e sua solução distribuída em alíquotas de 3 µl na região central de membranas carreadoras previamente posicionada em seus respectivos suportes. Os discos resultantes, contendo as micropartículas incrustadas com DNA foram estocados em placas de Petri contendo gel de sílica, as quais foram colocadas em dessecador por 5 minutos.

### **5.2.3 Bombardeamento**

Posteriormente à disposição dos embriões nas placas de Petri e confecção dos discos de membrana, o bombardeamento da região do meristema apical dos eixos embrionários da soja foi realizado utilizando-se um acelerador de micropartículas de alta pressão de gás hélio. A pressão de vácuo empregada foi de 27 polegadas de Hg e as diretrizes experimentais e distâncias entre cada componente do sistema de bombardeamento foram organizadas de maneira a seguir o especificado em Aragão *et al.* (1996).

### 5.3 Seleção, cultivo e aclimação das plântulas bombardeadas

Para induzir a multibrotação de plantas transformadas, as placas contendo os eixos embrionários bombardeados foram inicialmente cultivadas no escuro por 24 horas a 25°C em meio de cultura MS suplementado com 22,2 µmol/L de benzilaminopurina (BAP), imazapyr (500µmol/L), 3% de sacarose, 0,6% de phytigel e pH5,7. Subsequentemente, para permitir o alongamento das multibrotações, os explantes foram transferidos para vidros magenta e cultivados sob as mesmas condições durante cerca de 4 semanas.

Após este período, plântulas putativamente positivas para o gene *QQS* – verificadas por análise de PCR (de acordo com o descrito no capítulo 5.4.1 desta dissertação) – foram transferidas para copos de plástico contendo substrato de terra e vermiculita (1/2:1), e vedadas em sacos plásticos umedecidos presos por linha elástica, os quais foram perfurados para maior entrada de ar após três dias de aclimação e posteriormente retirados passada uma semana deste processo. Após aproximadamente trinta dias, as plantas sobreviventes foram transferidas para vasos maiores contendo solo e vermiculita para a produção de sementes. Plantas positivas triunfantes tiveram sua transgenia adicionalmente conferida pela técnica de *Southern blot* (Southern, 1975), como descrito no capítulo 5.4.3 desta dissertação.

A análise da progênie de plantas transgênicas duplamente confirmadas – tanto por PCR, quanto por *Southern blot* – foi realizada por PCR com o DNA genômico extraído da raspagem do tecido tegumentar de suas sementes, tal como o protocolado nos capítulos 5.4.1 e 5.4.2 desta dissertação.

## **5.4 Análise das plantas transformadas**

Após a extração de DNA genômico foliar das plantas transformadas, as amostras obtidas, para cada planta, passaram por rodadas de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a visualização e confirmação da introdução do gene *QQS* via corrida eletroforética em gel de agarose. Por conseguinte, e como etapa final de averiguação, o material genômico das plantas putativamente positivas foi analisado por técnica de *Southern blot*, abordagem a qual foi empregada como prova cabal acerca da integração do gene de interesse em cada indivíduo analisado.

### **5.4.1 Extração de DNA genômico**

Para cada planta a ser analisada, 20-40 mg de tecido vegetal fresco foram coletados e macerados em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. Cada amostra resultante foi então incubada em banho seco (65°C por 20 minutos) após adicionados 200 µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 mol/l NaCl, 0,2%, 2-mercaptoetanol, 20mmol/l EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) às mesmas. Posteriormente, acrescidas de 200 µl de clorofil, agitadas por 3 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por cinco minutos, as amostras tiveram seus sobrenadantes transferidos, cada uma, para um novo tubo de 1,5 ml. Estes sobrenadantes, após acrescidos com 150 µl de isopropanol gelado foram centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. O precipitado de cada tubo foi posteriormente recuperado e submetido a etapas de lavagem e centrifugação com etanol 70%. Por fim, cada amostra de DNA foi precipitada por centrifugação, recuperada e re-suspendida em 30 µl de água milli-Q autoclavada.

### **5.4.2 Verificação de plantas positivas por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As amostras de DNA genômico obtidas no capítulo 5.4.1 desta dissertação passaram por reações de PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (5'-GGGGGATCTGGATTTTAGTACTGG-3' e 5'-AAGACTAACAGGGAACAGGAGA-3') para amplificação de um fragmento esperado de aproximadamente 376pb abrangendo

a sequência do gene *QQS* dentro do vetor pβCongQQS. Em questão, cada reação (25µl) foi composta por tampão de PCR (10x), MgCl<sub>2</sub> (3mM), DNTP's (10mM), oligonucleotídeos iniciadores (10mM), 1 U Taq polimerase, 10ng de DNA genômico e água milli-Q autoclavada q.s.p. As reações passaram pelo seguinte programa em termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD): 3 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C; 30 segundos a 58°C; 40 segundos a 72°C) e extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% (p/v) – com brometo de etídio 0,5 µg/mL – e visualizados por corrida eletroforética seguida de exposição UV em aparelho de foto-documentação (BIO-RAD).

#### **5.4.3 Detecção do fragmento por *Southern blot***

Após verificação por PCR, plantas putativamente transgênicas foram crescidas em casa de vegetação e tiveram seu material genômico posteriormente submetido a experimento de hibridização por *Southern blot* como via de validação adicional para confirmação da integração do gene *QQS*. O desenho experimental e as diretrizes operacionais para técnica de *Southern blot* seguiram o protocolado por (Romano e Vianna, 2015).

##### **5.4.3.1 Extração de DNA genômico**

Para cada planta foi coletado aproximadamente 1 grama de material vegetal foliar. Estas amostras, após separadamente maceradas com nitrogênio líquido, foram transferidas para falcons de 50 ml, suplementadas com 15 ml de tampão CTAB e deixadas a 65°C por 20 minutos. Subsequentemente, 1 volume de clorofórmio foi adicionado a cada uma das amostras, as quais tiveram suas fases emulsificadas por inversão cuidadosa dos tubos. Após isso, centrifugou-se (10.000G por 10 minutos a -4°C) e recuperou-se com o auxílio da pipeta aproximadamente 15 ml de sobrenadante de cada amostra, o qual foi transferido para novo tubo falcon de 50 ml. Estes novos tubos foram então preenchidos com 1 volume de clorofórmio, homogeneizados por inversão e centrifugados (10.000G por 10 minutos a -4°C). Após a recuperação e transferência dos sobrenadantes resultantes para novos tubos falcon, estas amostras foram preenchidas com 1 volume de isopropanol,

homogeneizadas por inversão e centrifugadas (10.000G por 20 minutos a -4°C). Após resgatados os precipitados de cada tubo, estes foram re-suspendidos em 500 µl de água e incubados a 37°C por 30 minutos. Os tubos resultantes foram centrifugados (10.000G por 2 minutos), os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos tubos de microcentrifuga de 2 ml, e a cada um destes foi adicionado um volume de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados (10.000G por 15 minutos) e tiveram os sobrenadantes recuperados e transferidos para novos tubos de microcentrifuga de 2 ml. Três volumes de etanol absoluto foram adicionados a cada tubo, os quais foram homogeneizados e posteriormente centrifugados (10.000G por 15 minutos). Os precipitados resultantes foram recuperados e re-suspendidos em 500 µl de água milli-Q.

#### **5.4.3.2 Digestões enzimáticas**

Para cada amostra de material genômico obtida no capítulo 5.4.3.1 desta dissertação, foi-se realizada uma reação de digestão enzimática utilizando-se XhoI (Thermo Fisher Scientific) como enzima de restrição. A 37°C por aproximadamente 14 horas, 10µg de DNA genômico foram digeridos em 400 µl de solução de digestão contendo a enzima de restrição (40 u), respectivo tampão enzimático (1X), e água q.s.p. Subsequentemente, cerca de 40 u da enzima foram adicionadas 12 horas após iniciada a digestão, para compensar a perda de atividade da enzima durante o tempo de incubação. As amostras obtidas de cada reação de restrição foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose 1% para visualização dos fragmentos resultantes.

#### **5.4.3.3 Hibridização**

O gel obtido – referente à digestão das amostras de DNA genômico com a enzima XhoI – foi, de maneira sequencial, coberto em solução de depurinação (HCl 0,2M) por 10 minutos, lavado duas vezes com água destilada, embebido em solução de desnaturação (NaOH 0,5M) por 30 minutos, novamente lavado, colocado em solução de neutralização (NaCl 1,5M, tris-HCl 0,5M pH7,2), lavado uma última vez com água destilada e posteriormente transferido para membranas de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia) em solução 20X SSC por 18 horas. A membrana resultante foi exposta a luz UV em

aparelho Stratalinker® (120mJ/cm<sup>2</sup>) para fixação do material transferido. Subsequentemente, a partir de sonda derivada do vetor pβCongQQS (cuja obtenção é descrita no capítulo 5.4.3.4 desta dissertação) marcada com α-<sup>32</sup>P-dCTP, a membrana foi hibridizada.

#### **5.4.3.4 Sonda para hibridização**

A sonda para o procedimento de hibridização descrito no capítulo 5.4.3.3 desta dissertação foi obtida por reação de digestão enzimática do vetor pβCongQQS. A região de aproximadamente 183pb correspondente ao gene *QQS* foi retirada do vetor pβCongQQS pela sua co-digestão com enzimas HindIII e EcoRI (Invitrogen™). Em seguida, realizou-se a corrida eletroforética da digestão em gel de agarose 1% para a posterior extração e purificação da banda referente ao gene *QQS* utilizando o kit de purificação *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e respectivo protocolo.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Construção do vetor plasmidial p $\beta$ CongQQS

Para a transformação genética da planta de soja com o gene *QQS* de *A. thaliana*, foi construído o vetor p $\beta$ CongQQS, o qual contém o promotor da  $\beta$ -conglucininina dirigindo a expressão do gene *QQS* e respectivo peptídeo sinal da proteína  $\beta$ -conglucininina. Este vetor foi construído a partir da transferência do gene *QQS* – inserido no vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS (Macrogem) – para o vetor p $\beta$ CongCVN (O'keefe *et al.*, 2015), de maneira a substituir o gene *CVN*. Neste contexto, após o sucesso na digestão enzimática dos vetores pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS e p $\beta$ CongCVN (Fig. 7), as bandas resultantes de interesse – gene *QQS* (183pb) e vetor p $\beta$ CongCVN livre da sequência de 312pb correspondente ao gene *CVN* – foram extraídas, purificadas e ligadas entre si para a obtenção do vetor de interesse p $\beta$ CongQQS, o qual teve sua construção preliminarmente confirmada por ensaio de restrição com enzimas EcoRI e HindIII (Invitrogen™) (Fig. 8).

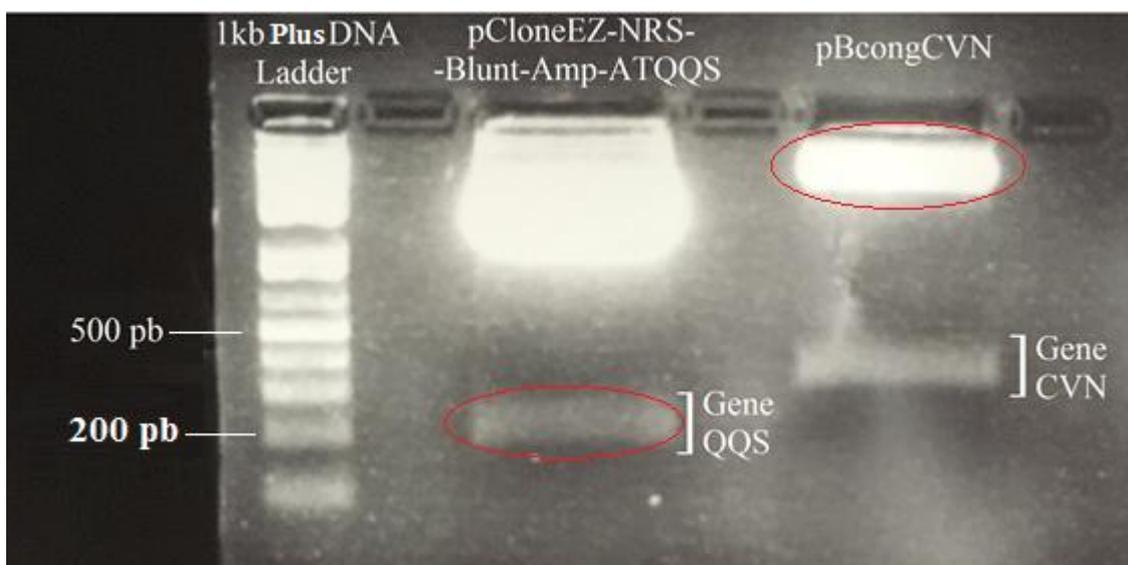


Figura 7. Corrida eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio referente à digestão enzimática dos vetores pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS e p $\beta$ CongCVN para a extração e posterior purificação das bandas obtidas referentes ao gene *QQS* e ao vetor p $\beta$ CongCVN livre da sequência do gene *CVN* (circuladas em vermelho). No primeiro poço encontra-se o marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™).

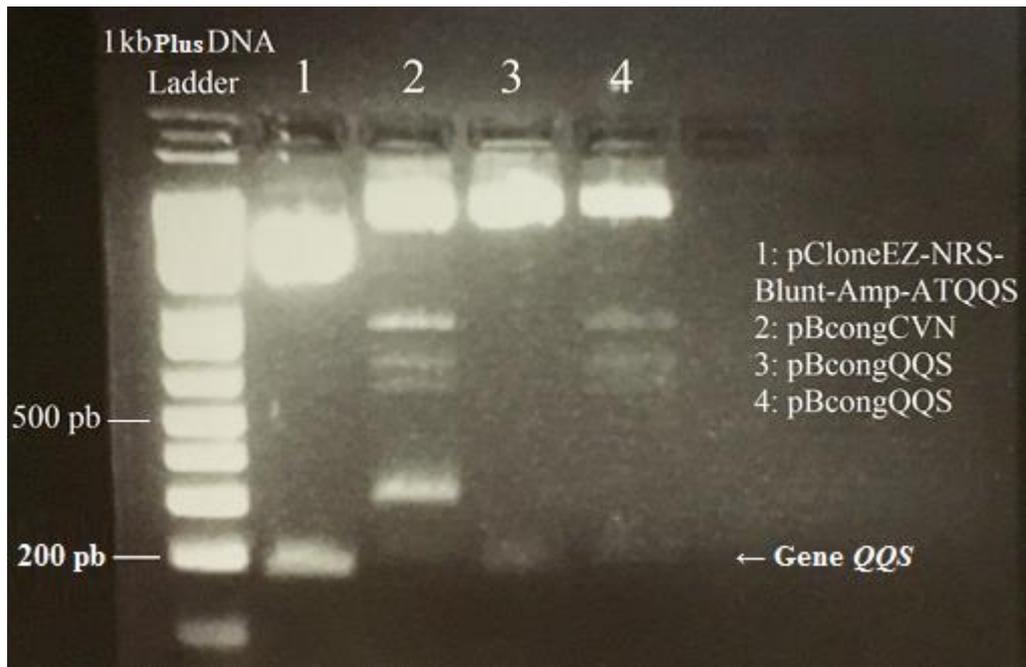


Figura 8. Corrida eletroforética em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio referente à digestão dos vetores pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp-AtQQS (1), pBcongCVN (2) e pBcongQQS (3 e 4) com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII (Invitrogen™). No primeiro poço encontra-se o marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™).

Embora o resultado do ensaio de digestão realizado anteriormente ter mostrado sucesso na obtenção do vetor p $\beta$ CongQQS, o mesmo foi enviado para sequenciamento para verificação adicional a respeito de sua composição nucleotídica.

Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu a clonagem e que não houve alteração de composição nucleotídica com respeito ao gene *QQS*. Na figura 9 encontra-se esquematicamente representado o vetor p $\beta$ CongQQS construído.

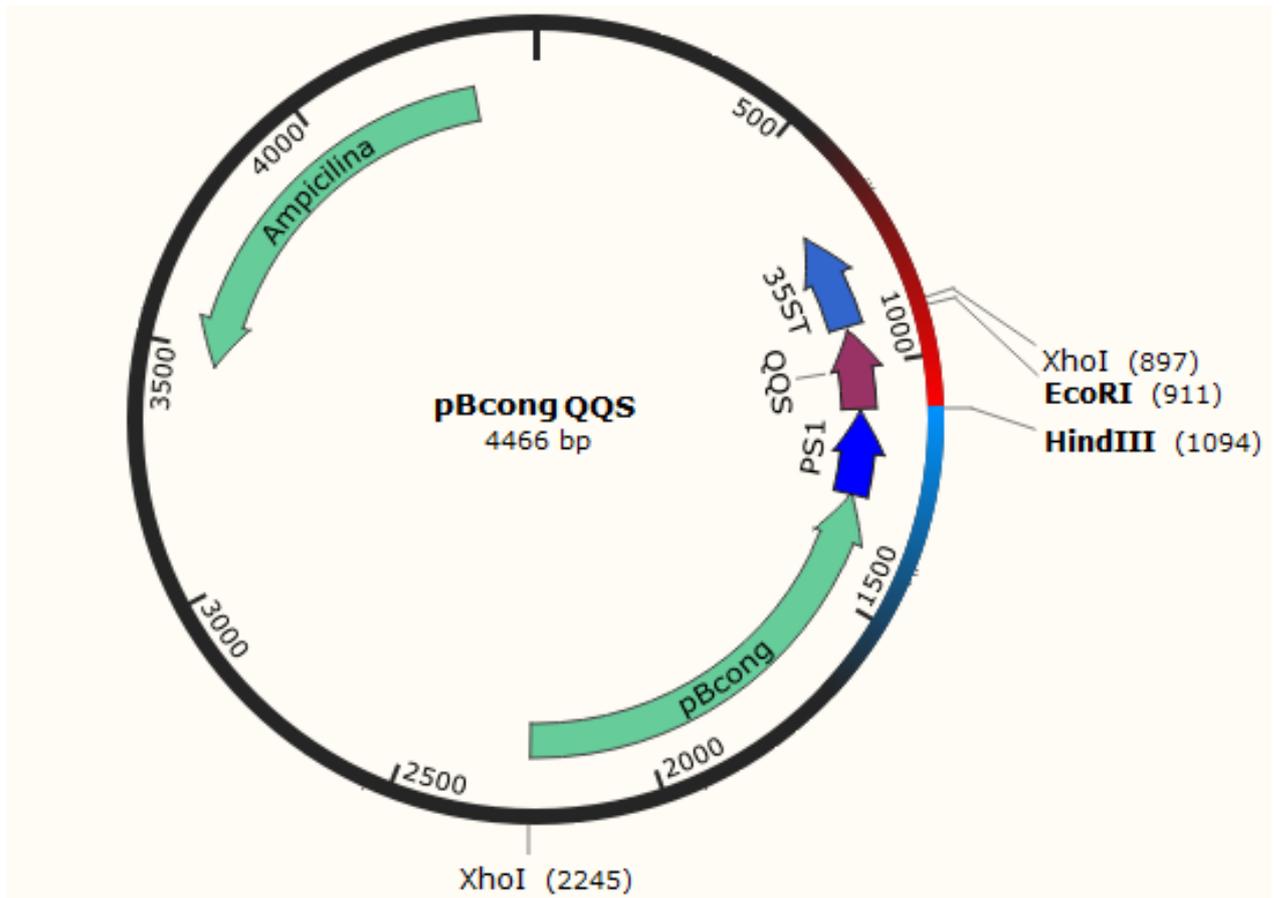


Figura 9. Representação esquemática do vetor construído, p $\beta$ CongQQS. Observa-se a presença do promotor da subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglicina, respectivo peptídeo sinal da proteína (PS1), o gene *QQS* e o terminador do RNA 35S do vírus do mosaico da couve flor, além do gene que confere resistência a ampicilina nas bactérias.

## 6.2 Transformação genética de *Glycine max* com o vetor pβCongQQS

Visando a obtenção de plantas de soja transformadas com o gene QQS, aproximadamente 600 embriões zigóticos de soja foram co-bombardeados com os vetores pβcongQQS e pAC321. Após o cultivo *in vitro* dos embriões em meio com o agente seletivo imazapyr, aproximadamente 40 plantas foram obtidas e transferidas para o solo. Estas plantas quando em cultivo na casa de vegetação foram analisadas por PCR para verificação da presença do gene *QQS*. Seis plantas apresentaram amplificação do gene *QQS* (Fig. 10).

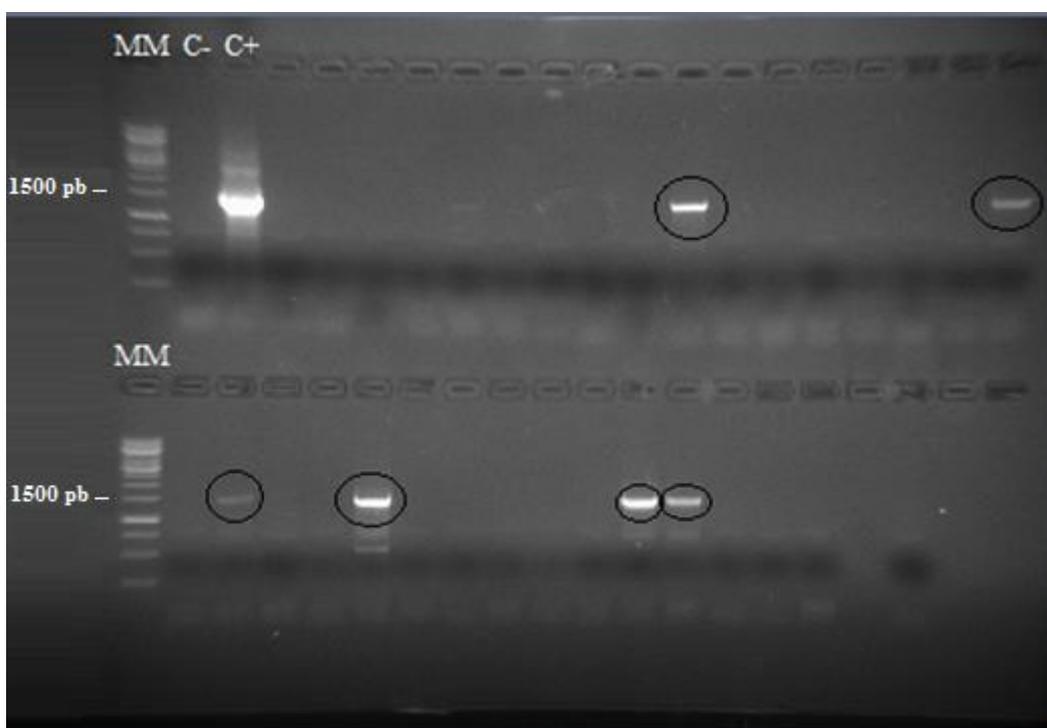


Figura 10. Análise por PCR de plantas ( $T_0$ ) de soja cv. BRS 7980 co-bombardeadas com o vetor pβCongQQS e o vetor pAC321 (contendo gene *ahas* mutado para resistência ao herbicida imazapyr) quanto à presença do gene *QQS* em seus extratos genômicos. A detecção evoluiu o par de primer Beta19XhoI e 35ST-BAMH1, para obtenção de um fragmento de aproximadamente 1562pb abrangendo a sequência do gene *QQS* dentro do vetor pβCongQQS. No primeiro e no vigésimo primeiro poço encontra-se o marcador molecular 1kb DNA Ladder (Promega) (MM), no segundo, o controle negativo referente a uma planta não transformada (C-), no terceiro, o controle positivo referente ao vetor pβCongQQS (C+), e nos demais poços, encontram-se as amostras. Estão circuladas as seis amostras sobre as quais houve a amplificação do fragmento de interesse.

### 6.2.1 Detecção do gene *QQS* por *Southern Blot*

De maneira a dar procedência a confirmação de transgenia, extraiu-se o DNA genômico foliar das seis plantas de soja positivas para o gene *QQS* por PCR. Neste contexto, a partir do material genômico obtido e quantificado, procedeu-se um a digestão com a enzima *Xho*I, esta enzima apresenta dois sítios de restrição no plasmídeo, localizados um no início do promotor  $p\beta$ cong e o outro no final do gene *QQS*, abrangendo uma sequência de 1348 pares de base. O gel resultante foi transferido para membrana de nylon e esta passou por procedimento de hibridização com sonda radioativa específica para detecção do gene *QQS*. A membrana hibridizada foi revelada e foi possível visualizar a presença do gene *QQS* no material genômico das plantas 2, 5 e 6 (Fig. 11). O fato da PCR apresentar seis plantas positivas para o gene *QQS* e o *Southern blot* apresentar apenas três pode ser explicado pela possível contaminação durante a PCR.

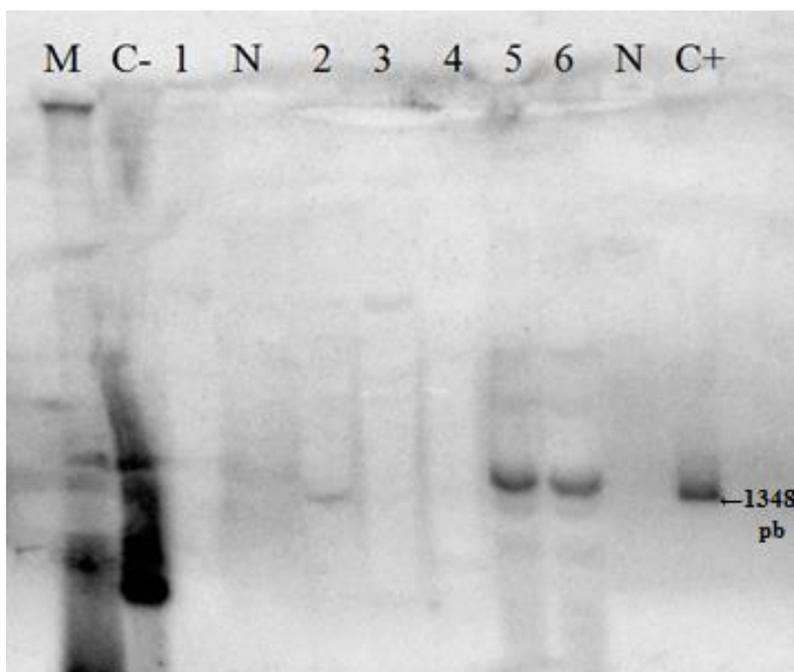
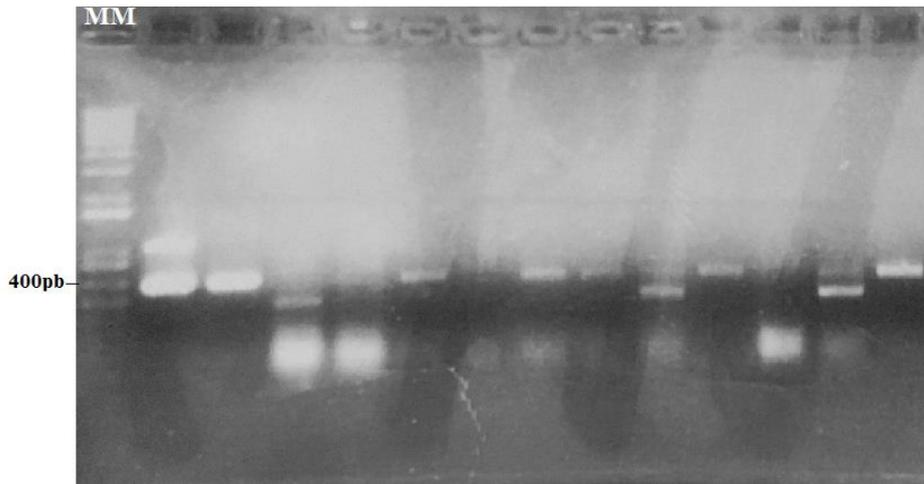


Figura 11. *Southern blot* com o DNA de seis plantas positivas por PCR (1, 2, 3, 4, 5, 6). Os DNAs foram digeridos com *Xho*I. O gene *QQS* marcado com  $^{32}P$  foi utilizado como sonda. Coluna marcador (M) – Marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder); Coluna controle negativo (C-) – Soja cv. BRS 7980 não transformada; Coluna controle positivo (C+) – Vetor  $pBcongQQS$  digerido com *Xho*I; Colunas vazias (N) – Nenhum material aplicado.

## 6.2.2 Análise da progênie de plantas transgênicas para o gene *QQS*

A partir dos dados obtidos pelas análises de PCR e *Southern Blot* das plantas de soja co-bombardeadas – com os vetores p $\beta$ CongQQS e pAC321 – e posteriormente regeneradas, foi confirmada, como visto anteriormente, a obtenção de três plantas T<sub>0</sub>, transgênicas para o gene *QQS* de *A. thaliana*. Neste contexto, sementes T<sub>1</sub> descendentes das plantas T<sub>0</sub> “2”, “5” e “6” foram preliminarmente avaliadas quanto à presença do gene *QQS* pela condução de experimentos de PCR direcionados à amplificação do gene *QQS* utilizando-se o extrato genômico de suas raspagens tegumentares. Para cada linhagem foram colhidas e analisadas cerca de 120 sementes, as quais – posteriormente a análise por PCR – não demonstraram a transferência do gene *QQS*. Sob escopo experimental adicional, as mesmas sementes analisadas foram plantadas em casa de vegetação e as plantas resultantes analisadas quanto à presença do gene *QQS* pela condução de experimentos de PCR sobre extratos genômicos de suas folhas. Os resultados referentes à assimilação do gene foram novamente negativos para todas as plantas. Ressalta-se que durante os experimentos de PCR visou-se, além da amplificação do gene *QQS*, a amplificação controle do gene da actina endógena (*ACT1*) (Fig. 12). Para este gene controle, o resultado foi positivo, o que indica que a ausência do gene *QQS* nas 360 plantas analisadas por PCR não pode ser atribuída a falhas experimentais durante o manuseio do material genético estudado. Por conclusão, também foi conduzido um experimento de *Dot Blot* com 24 amostras aleatórias de DNA genômico T<sub>1</sub>, utilizando-se a sonda de detecção para o gene *QQS* produzida durante o experimento de *Southern Blot* das plantas T<sub>0</sub>. Os resultados foram novamente negativos para a presença do gene *QQS*.

Segundo Aragão et al. (1996), embora a maior parte das plantas-mãe transgênicas transmitam seus genes exógenos para futuras gerações, há casos em que isso não ocorre. Excluindo-se a simples não transferência do transgene, os resultados obtidos neste trabalho para a ausência do gene *QQS* em plantas T<sub>1</sub> pode estar relacionado a variados processos moleculares – variações somaclonais advindas da regeneração das plantas bombardeadas, desorganizações cromossômicas, quimeirismos, ou transformações unicamente epidérmicas sobre as plantas T<sub>0</sub> – cuja investigação detalhada é vital para uma explicação satisfatória deste fenômeno.



**Figura 12.** Análise por PCR de plantas ( $T_1$ ) quanto à presença do gene da actina endógena (*ACT1*) em seus extratos genômicos foliares. A detecção evoluiu o par de primeres ACT1F e ACT1R, para obtenção de um fragmento de aproximadamente 400pb. No primeiro poço encontra-se o marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (MM) e nos demais poços encontram-se amostras  $T_1$  aleatoriamente escolhidas para as três linhagens transgênicas obtidas.

## 7. CONCLUSÃO

O referente trabalho objetivou a transformação por biobalística de plantas de soja com o gene exógeno *QQS* sob controle do promotor da beta conglicinina de soja como forma de direcionar a expressão deste transgene à semente de plantas transgênicas. Após a condução experimental, seleção e regeneração de aproximadamente 600 plantas bombardeadas, obteve-se três plantas cuja presença do transgene *QQS* foi duplamente confirmada por técnicas de PCR e *Southern Blot*. Entretanto, o transgene não foi detectado na geração T<sub>1</sub>, fato discutido neste trabalho. Futuras análises metabólicas do efeito do transgene *QQS* em soja quando regulado pelo promotor da beta conglicinina serão de grande importância para se estudar a atividade da proteína *QQS* quando esta encontra-se compartimentalizada nos PSVs da semente, desassociada a fatores de transcrição.

## 8. PERSPECTIVAS

Com o intuito de se gerar plantas de soja com o gene *QQS* inserido de forma estável em seus genomas, será desenhado um novo vetor de bombardeamento, o qual contém – além das sequências encontradas no vetor p $\beta$ Cong*QQS* – o gene repórter *gus* e o gene de seleção *ahas*. O gene repórter em questão será empregado para fins de auxílio na identificação das plantas transformadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais).. **Estatística Mensal do Complexo Soja**, 2018. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br>>

ARAGAO, F. J. et al. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. **Theor Appl Genet**, v. 93, n. 1-2, p. 142-50, 1996.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 1-2, p. 1-6, 2000.

ARENDSEE, Z. W.; LI, L.; WURTELE, E. S. Coming of age: orphan genes in plants. **Trends Plant Sci**, v. 19, n. 11, p. 698-708, 2014.

BADLEY, R. A. et al. The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. **Biochim Biophys Acta**, v. 412, n. 2, p. 214-28, 1975.

BAUNGRATZ, K. L., 2013-; MISSIO, R. F. Transformação genética da soja pela técnica de biobalística, **Universidade Federal do Parana**, 2013.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: Embrapa, CNPSo, 1987.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas. Sete Lagoas- MG: **Embrapa milho e sorgo**, nº 32, 42p., 2004.

CARROLL, K. K. Dietary protein, cholesterolemia and atherosclerosis. **CMAJ**, v. 147, n. 6, p. 900, 1992.

CHAUDHARY, J. et al. Expanding Omics Resources for Improvement of Soybean Seed Composition Traits. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 1021, 2015.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Monitoramento Agrícola), 2018. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/monitoramento-agricola> >.

CUNHA, J. P. A. R. D. et al. Spray deposition on soybean crop in aerial and ground application. **Eng. Agríc.**, v. 31, n. 2, p. 343-351, 2011.

DONOGHUE, M. T. et al. Evolutionary origins of Brassicaceae specific genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Evol Biol**, v. 11, p. 47, 2011.

FERREIRA, E. D. S. Efeito da proteína Beta-Conglicinina da soja no metabolismo lipídico de animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Dissertação de mestrado, **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, 103 p., 2008.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. **J Vis Exp**, v. 6, 2007.

GLICK, B. R.; THOMPSON J.E (Eds.). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. **CRC Press**, Boca Raton, 2017.

GOLDSMITH, P. D. Economics of Soybean Production, Marketing, and Utilization. Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization, **AOCS Press**, Urbana, IL, p. 117-150, 2008.

GOLLERY, M. et al. What makes species unique? The contribution of proteins with obscure features. **Genome Biol**, v. 7, n. 7, p. R57, 2006.

HARTMAN, G. L. et al. Evaluation of Perennial Glycine Species for Resistance to Soybean Fungal Pathogens That Cause Sclerotinia Stem Rot and Sudden Death Syndrome. **Crop Sci**. v. 40, p. 545–549, 2000.

HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E. How a soybean plant develops. Special Report 62. **Iowa State University Cooperative Extension Service**, 1967.

HOMRICH, M. S. et al. Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. **Genet Mol Biol**, v. 35, p. 998-1010, 2012.

HONG, K. J.; LEE, C. H.; KIM, S. W. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. **J Med Food**, v. 7, n. 4, p. 430-435, 2004.

HYMOWITZ, T.; NEWELL, C. A. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. **Economic Botany** v. 35, p. 272-288, 1980.

KANTOLIC, A. G.; PERALTA, G. E.; SLAFER, G. A. Seed number responses to extended photoperiod and shading during reproductive stages in indeterminate soybean. **European Journal of Agronomy**, v. 51, p. 91-100, 2013.

KARESCH, H. et al. Direct gene transfer to protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep**, v. 9, n. 10, p. 571-574, 1991.

KIM, M. et al. Identification and fine mapping of a soybean seed protein QTL from PI 407788A on chromosome 15. **Crop Science**, v. 56, n. 1, p. 219-225, 2016.

KIM, W. S.; KRISHNAN, H. B. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells. **Plant Biotechnol J**, v. 2, n. 3, p. 199-210, 2004.

KLEIN, T. M. et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, n. 6117, p. 70, 1987.

LACORTE, C. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., et al (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa-SPI**; Embrapa-CNPq, v. 2, p.761-781, 1999.

LALOUM, T. et al. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? **Trends Plant Sci**, v. 18, n. 3, p. 157-166, 2013.

LANDGRAF, L. Engenharia genética: decifrando o código da vida. 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/xxi-ciencia-para-a-vida/busca-de-noticias/-/noticia/8533306/engenharia-genetica-decifrando-o-codigo-da-vida> >. Acesso em: 25/09/2018.

LI, D. et al. A de novo originated gene depresses budding yeast mating pathway and is repressed by the protein encoded by its antisense strand. **Cell Res**, v. 20, n. 4, p. 408-420, 2010.

LI, L. et al. Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in *Arabidopsis* leaves. **Plant J**, v. 58, n. 3, p. 485-498, 2009.

LI, L.; WURTELE, E. S. The QQS orphan gene of *Arabidopsis* modulates carbon and nitrogen allocation in soybean. **Plant Biotechnol J**, v. 13, n. 2, p. 177-87, 2015.

LI, L. et al. QQS orphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 47, p. 14734-9, 2015.

LIU, G.; XIONG, Y. L.; BUTTERFIELD, D. A. Chemical, Physical, and Gel-forming Properties of Oxidized Myofibrils and Whey- and Soy-protein Isolates. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 811-818, 2000.

LIU, K. Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization. **International Thomson Publishing**, p. 25-90, 1997.

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

NARDINI, M. et al. Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. **Cell**, v. 152, n. 1-2, p. 132-143, 2013.

O'KEEFE, B. R.; MURAD, A. M.; VIANNA, G. R.; RAMESSAR, K.; SAUCEDO, C. J.; WILSON, J.; BUCKHEIT, K. W.; DA CUNHA, N. B.; ARAÚJO, A. C.; LACORTE, C. C.; MADEIRA, L.; MCMAHON, J. B.; RECH, E. L. Engineering soya bean seeds as a scalable platform to produce cyanovirin-N, a non-ARV microbicide against HIV. **Plant Biotechnol J**, v. 13, n. 7, p. 884-892, 2015.

OLIVEIRA, A. B. D. Fenologia, desenvolvimento e produtividade de cultivares de soja em função de épocas de semeadura e densidades de plantas. Tese (Mestrado em Agronomia) - **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, São Paulo, 2010.

PATIL, G. et al. Molecular mapping and genomics of soybean seed protein: a review and perspective for the future. **Theor Appl Genet**, v. 130, n. 10, p. 1975-1991, 2017.

PETTERSSON, D.; PONTOPPIDAN, K. Soybean Meal and The Potential for Upgrading Its Feeding Value by Enzyme Supplementation. **Soybean–Bio-Active Compounds**, p. 287–307, 2013.

PIMENTEL, D.; PIMENTEL, M. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 660-663, 2003.

PRABH, N.; RÖDELSPERGER, C. Are orphan genes protein-coding, prediction artifacts, or non-coding RNAs? **BMC Bioinformatics**, v. 17, 2016.

PURCELL, L.; SALMERON, M.; L, A. Arkansas Soybean Production Handbook - MP197, 2014.

RAMOS, M. L. G.; BATISTA, F. P. D. S.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. Potencial de tolerância à seca de genótipos de trigo e soja em condição de Cerrado. 108 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - **Universidade de Brasília**, Brasília, 2017.

RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). Manual de transformação genética de plantas. **Embrapa-SPI**, p. 51-64, 1998.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGAO, F. J. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nat Protoc**, v. 3, n. 3, p. 410-408, 2008.

ROMANO, E.; VIANNA, G. R. Análise da integração de transgenes pela técnica de Southern blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). Manual de transformação genética de plantas. **Embrapa-SPI**, 2015.

SANFORD, J. C. The Biolistic Process. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 12, p. 299-302, 1988.

SARTORETTO, L. M. et al. Genetic transformation: Strategies for forest species breeding. **Cienc. Rural**, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. **Ed. Varela**, São Paulo, SP., 517p., 1996.

SILVA, A. C.; LIMA, E. P. C.; BATISTA, H. R. A importância da soja para o agronegócio brasileiro: uma análise sob o enfoque da produção, emprego e exportação. In: V Encontro de Economia Catarinense, Florianópolis, SC. Anais. Florianópolis, **UNESC**, 2011.

SILVA, C. O. D. et al. Influência do processamento na qualidade proteica de novos cultivares de soja destinados à alimentação humana. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 389-397, 2010.

SILVEIRA, A. B. et al. Extensive Natural Epigenetic Variation at a De Novo Originated Gene. **PLoS Genet**, v. 9, 2013.

SINGH, P. et al. Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 1, p. 14-28, 2008.

SOARES, C. D.; MENESES, C. H. G.; ARAUJO, J. L. S.; VIDAL, M. S. Um panorama sobre regeneração in vitro e transformação genética de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Embrapa Agrobiologia**, 2010.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v. 98, n. 3, p. 503-17, 1975.

TAUTZ, D.; DOMAZET-LOSO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 10, p. 692-702, 2011.

USDA, United States Department of Agriculture, Soybeans | USDA Foreign Agricultural Service. 2018.

VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J.; RECH, E. L. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). **Genet Mol Res**, v. 10, p. 382-390, 2011.

WILLIS, S. The use of Soybean Meal and Full Fat Soybean Meal by the Animal Feed Industry. 12th Australian Soybean Conf. Proc.; Toowoomba, Queensland: **North Australian Soybean Industry Association**, p. 1-8, 2003.

WISSELER, L. et al. Mechanisms and Dynamics of Orphan Gene Emergence in Insect Genomes. **Genome Biol Evol**, v. 5, p.439-455, 2013.

WOLF, W. J. Soybean proteins: Their production, properties, and food uses. A selected bibliography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 1974.

YAKLICH, R. W. Beta-Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 2, p. 729-735, 2001.

YAMADA, Y. et al. Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novokinin. **Peptides**, v. 29, n. 3, p. 331-337, 2008.