



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Introdução do gene *RcDREB1* de mamona em tabaco e soja
visando tolerância ao estresse hídrico

Tomas Felipe Costa do Rego

Brasília
Distrito Federal – Brasil
2020

TOMAS FELIPE COSTA DO REGO

Introdução do gene *RcDREB1* de mamona em tabaco e soja
visando tolerância ao estresse hídrico

Tese apresentada a
Universidade de Brasília como parte
das exigências do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia e
Biodiversidade para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

Brasília
Distrito Federal - BRASIL
2020

Dedico à Natália e ao seu
lindo sorriso.

Agradecimentos

À Natália por ser uma deusa, uma louca, uma feiticeira na minha vida. Por cada série, filme, conversa, sorriso, lanches, chás no Outback e pelo incentivo para continuar essa jornada de quase 10 anos.

Ao meu pai José por todos os ensinamentos e apoio, além das discussões sobre o cotidiano, história, biologia e aliens. À minha mãe Ioleth por sempre me ensinar o valor do conhecimento me apoiando e incentivando e comemorando a cada um dos meus resultados. À minha família: Tiago, Katy e Heitor, que é o neném mais fofo, Mateus, Marcela e Kuro, Pedro, Junior, Rosangela, Yasmin e Darazinha que sempre me olha com a maior felicidade quando chego em casa, pelos momentos de descontrações e felicidade.

Ao meu orientador Francisco Aragão por ter concedido a oportunidade, pelos ensinamentos, paciência e incentivo em cada resultado obtido. À Gláucia Elsa, e Kenny pela ajuda das atividades do laboratório, agradeço também à Mirella por me ajudar nas análises, e ao Thomas pelo auxílio com as quantificações.

Aos companheiros de bancada: Dona Tatiane Maria e Seu Pedro. À todos os membros do LEG e agregados: Lilian, Jéssica, Nathália, Giovanni, Thais, ESTELA!!, Cristobal, Dona Lídia Maria, Pabline, Amanda, Heitor, Cristina, Angélica, Renato, Cristiane e Abdul por todos os cafés e momentos de alegria que jamais serão esquecidos. Também agradeço aqueles que ficaram pouco tempo, mas sempre serão lembrados com carinho Paula, Pedro, Bruna e Sara.

Em especial à Aninha que sempre me aconselhou, apoiou e ensinou desde o início da minha vida acadêmica.

Agradeço à Alexandra Elbakyan por ter criado o Sci-hub.

À CAPES, pela bolsa e financiamento, e à Embrapa pelo espaço físico e equipamentos.

Além disso, agradeço à todos os outros que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À todos, um muito obrigado!

Só não agradeço a CEB por todas as quedas na energia.

“Em todos esses anos nessa indústria vital, essa é a primeira vez que isso me acontece.” – Smedly

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 Concentração de prolina durante o período do teste de seca em plantas de tabaco. WT plantas de tabaco não transgênicas: P6, P11, P16, P17 linhagens de tabaco transgênicas. O asterisco representam diferenças significativas pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$)	27
Figura 2 Germinação de tabaco em meio MS, ABA NaCl e Manitol; (A) Controle; (B) Manitol 200 mM; (C) ABA 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$; (D) NaCl 25 mM; (E) ABA 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$; (F) NaCl 50 mM; (G) 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$; (H) NaCl 75 mM.....	30
Figura 3 Germinação total de tabaco: A) Meio Controle, Meio NaCl 75 mM Meio Manitol 200 mM;. B) Meio controle, ABA 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ABA 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ABA 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O asterisco representam diferenças significativas pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$).	32
Figura 4 Vetor pRcDREB contendo o gene <i>RcDREB1</i> controlado pelo promotor 35SCaMV e o gene de seleção bar controlado pelo promotor 35SCaMV.....	44
Figura 5 Vetor pRcDREBAHAS contendo o gene <i>RcDREB1</i> controlado pelo promotor AtACT2 e o gene de seleção ahas controlado pelo promotor 35SCaMV	44
Figura 6 PCR da progênie de duas linhagens bar positivas. De 1 a 9: progênie da linhagem 11.11.1; de 10 a 17: progênie da linhagem 11.8.4.; C- planta não transgênica; B reação sem DNA; C+: o plasmídeo como controle positivo.....	49
Figura 7 Taxa de assimilação líquida de CO_2 (fotossíntese), durante o período de estresse hídrico da linhagem transgênica e controle WT.....	50
Figura 8 Transpiração foliar durante o estresse hídrico da linhagem transgênica 8.4 e do controle WT.....	51
Figura 9 Condutância estomática durante um período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT.....	52
Figura 10 Eficiência no uso da água durante o período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT.....	52
Figura 11. Teor relativo de água nas folhas durante o período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT.....	53

Tabela 1 Concentração de ABA, NaCl e Manitol por meio de germinação.....	25
Tabela 2 Transformação genética de soja com os vetores pRcDREB e pRcDREBAHAS.	50

Resumo

REGO, Tomas Felipe Costa do. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, Janeiro de 2020. Introdução do gene *RcDREB1* de mamona em tabaco e soja visando tolerância ao estresse hídrico.

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

As plantas possuem grande vulnerabilidade às condições ambientais sofrendo múltiplos tipos de estresses como frio, falta de água, salinidade e excesso de luminosidade. Ao longo da sua evolução, surgiram estratégias de adaptação a ambientes desfavoráveis como genes de proteção e fatores de transcrição. Dentre os genes relacionados à tolerância a estresses, foi observado que os genes DREB possuem o grande envolvimento com respostas a estresse abiótico. O promotor do gene *RcDREB1* de mamona (*Ricinus communis* L.) foi estudado por Cipriano *et al.* (2013) que analisaram a expressão do gene *gus* com o promotor do gene *RcDREB1* em plantas transgênicas de tabaco. A expressão da proteína *GUS* foi observada somente em grãos de pólen durante a antese. Ao expressar o gene *RcDREB1* de forma constitutiva em tabaco foi observado um maior desenvolvimento das plantas transgênicas durante um período de estresse hídrico controlado. Como complemento a esses estudos este trabalho avaliou a variação interna de prolina durante o período de estresse hídrico e a resposta das plantas a ABA, NaCl e manitol. Os resultados obtidos indicam que o gene *RcDREB1* tem potencial para ser usado nos programas de melhoramento de cultivares de grande importância econômica como soja. Além disso, no presente trabalho o gene *RcDREB1* foi utilizado para gerar plantas transgênicas de soja com o intuito de obter plantas tolerantes a estresse hídrico, contudo somente uma linhagem de soja transgênica foi obtida e esta linhagem não mostrou alta tolerância a estresse hídrico quando submetida aos testes de seca.

Palavras chave: *RcDREB1*; estresse abiótico, soja, tolerância a seca.

Abstract

REGO, Tomas Felipe Costa do. Biotechnology and Biodiversity PhD Program, University of Brasília. ,January 2020. Introduction of *RcDREB1* gene from castor bean in tobacco and soybean aiming water stress tolerance.

Adviser: PhD Francisco José Lima Aragão.

Plants are highly vulnerable to environmental conditions suffering different types of stresses such as cold, lack of water, salinity and excess of light. Throughout evolution, strategies for adapting to unfavorable environments have emerged, such as protective genes and transcription factors. Among the genes related to stress tolerance, it was observed that the DREB genes are highly involved with responses to abiotic stress. The promoter of the castor bean *RcDREB1* gene (*Ricinus communis* L.) was studied by Cipriano *et al.* (2013) who analyzed the expression of the *gus* gene under the domain of the *RcDREB1* gene promoter in transgenic tobacco plants. GUS protein expression was observed only in pollen grains during anthesis. When expressing the *RcDREB1* gene constitutively in tobacco, a greater development of transgenic plants was observed during a period of controlled water stress. As a complement to these studies, this work evaluated the internal variation of proline during the period of water stress and the response of plants to ABA, NaCl and mannitol. The results obtained showed that the *RcDREB1* gene shows potential to be used in breeding programs to generate tolerant cultivars of economic importance such as soybeans. In addition, in the present work the *RcDREB1* gene was used to generate transgenic soybean plants in order to obtain water stress tolerant plants, however only one transgenic soybean strain was obtained and this strain did not show high tolerance to water stress when submitted to drought tests.

Keywords: *RcDREB1*; abiotic stress, soybean, drought tolerance.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Lista de Figuras e Tabelas.....	vi
Resumo	viii
Abstract.....	ix
Introdução.....	12
Capítulo 1 – Introdução do gene <i>RcDREB1</i> em tabaco.....	15
Revisão bibliográfica	16
Estresse hídrico	16
Plantas transgênicas com tolerância a estresse hídrico	18
Genes <i>DREB</i> e plantas.....	19
<i>RcDREB1</i>	20
Justificativa.....	22
Objetivos	23
Objetivo geral	23
Objetivos específicos.....	23
Material e Métodos.....	24
Extração e quantificação de prolina.....	24
Teste de germinação com estresse por NaCl, Manitol e ABA	25
Análise estatística.....	26
Resultados	27
Quantificação de prolina	27
Teste de germinação com ABA, NaCl e Manitol.....	27
Discussão.....	33
Capítulo 2 - Introdução do gene <i>RcDREB1</i> em soja (<i>Glycine max</i> L.)...	36
Revisão bibliográfica	37
Soja	37

Transformação genética de soja por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	39
Justificativa.....	41
Objetivos	42
Objetivo geral	42
Objetivos específicos.....	42
Materiais e Métodos	43
Vetores de transformação	43
Transformação genética de soja	45
Análises das plantas regeneradas.....	46
Teste de tolerância a estresse hídrico <i>in vivo</i>	47
Análise da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração, eficiência instantânea do uso da água.	47
Teor relativo de água.....	48
Delineamento experimental e análises estatísticas	48
Resultados	49
Transformação de soja via <i>Agrobacterium</i>	49
Testes de tolerância ao estresse hídrico	50
Discussão.....	54
Conclusão.....	56
Perspectivas	57
Referências Bibliográficas	58
Anexo 1.....	67
Anexo 2.....	68

Introdução

Estresses abióticos são estresses que não são causados por seres vivos, patógenos ou predadores, tendo como causa as condições ambientais em que as plantas estão inseridas (Wang *et al.* 2017).

As plantas possuem uma grande vulnerabilidade às condições ambientais, sofrendo múltiplos tipos de estresses, dentre eles os mais comuns são frio, falta de água, excesso de luminosidade e salinidade (Rehman e Mahmood 2015). Dentre os estresses abióticos mais danosos às grandes culturas está o estresse hídrico (Porcel e Ruiz-Lozano 2004), que é o estresse causado pela baixa disponibilidade de água para a planta (Chen *et al.* 2009). O estresse hídrico pode impedir o crescimento da planta, e em cenários mais graves pode acarretar danos ao maquinário celular causando a sua morte (Mizoi *et al.* 2012). Através da seleção natural, as plantas têm desenvolvido eficientes estratégias de adaptação ao estresse hídrico, possibilitando sua sobrevivência em ambientes desfavoráveis (Janiak *et al.* 2016).

Com frequência, a ativação das defesas contra os possíveis danos celulares causados pelo estresse hídrico ocorre com a expressão de diversos genes de proteção e fatores de transcrição (FT) (Gupta *et al.* 2014). Assim, diversos genes de tolerância a estresse abiótico e fatores de transcrição têm sido isolados em diferentes espécies de plantas e estudados em organismos modelo para identificar e comprovar sua função durante o estresse abiótico (Agarwal *et al.* 2013).

Dentre os genes relacionados à tolerância a estresses, foi observado que os genes da superfamília APETALA2/Ethylene Responsive element-binding Factor (AP2/ERF) apresentaram relação com estresses abióticos e bióticos, (Mizoi *et al.* 2012). A superfamília AP2/ERF é dividida em quatro famílias (AP2, RAV, ERF e DREB) e, dentre elas, foi constatado que a família DREB possui o maior envolvimento com respostas a estresse abiótico (Mizoi *et al.* 2012). A família DREB é composta por fatores de transcrição com elementos *cis-acting* do tipo dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) que regulam a transcrição de cascatas gênicas, elevando a capacidade de tolerância ao estresse da planta. A família DREB por sua vez é

subdividida em seis subfamílias DREB A-1 a DREB A-6, cada subfamília possui sua forma de ação. (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki 2006; Mizoi *et al.* 2012).

O gene *RcDREB1*, que pertence a subfamília DREB, foi identificado por Cipriano *et al.* (2013). O grupo estudou o promotor do gene *RcDREB1* de mamona (*Ricinus communis* L.) analisando a expressão do gene *gus* sob seu domínio em plantas transgênicas de tabaco. A expressão da proteína GUS foi observada somente em grãos de pólen durante a antese, quando os grãos de pólen são liberados no ambiente. Por análise da sequência nucleotídica do promotor, foi verificada a presença de um motivo pólen-específico indicando que o promotor *RcDREB1* pode ter alguma função no desenvolvimento floral. Além disso, foi o primeiro promotor DREB pólen específico caracterizado de mamona. Em análises filogenéticas, foi constatado que o gene *RcDREB1* pertence ao grupo A-5 (Cipriano *et al.* 2013).

Ao expressar o gene *RcDREB1* de forma constitutiva em tabaco foi observado um maior desenvolvimento das plantas transgênicas durante um período de estresse hídrico controlado. Os resultados obtidos mostraram que o gene *RcDREB1* teria potencial para ser usado nos programas de melhoramento de cultivares de grande importância econômica (Rego, 2015).

Um dos possíveis empregos do gene *RcDREB1* seria na cultura da soja (*Glycine max* L.), uma cultura de grande importância econômica mundial. Atualmente, a soja é uma das maiores *commodities* agropecuárias de grande importância para a economia brasileira (CONAB, 2018). É amplamente utilizada para o consumo humano na forma de óleo e outros subprodutos como a proteína. Além disso, tem grande emprego na produção de ração animal e na produção de biodiesel (Kidokoro *et al.* 2015).

Para suprir a alta demanda por essas *commodities* há a necessidade de cultivares com maior adaptabilidade às regiões produtoras (Wang *et al.* 2017). Uma das maiores limitações para a produção de soja é a disponibilidade de água. Em trabalhos em casa-de-vegetação foi observada a redução na produção entre 24% a 50% após o estresse hídrico, podendo ser ainda maior dependendo da severidade e estágio de desenvolvimento das plantas (He *et al.* 2017).

Com o intuito de reduzir as perdas na produção de soja causadas por secas ou por má distribuição das chuvas, a produção de cultivares

geneticamente modificadas se mostra como uma alternativa viável por permitir a introdução de genes de tolerância à seca já conhecidos pela comunidade científica (Mizoi *et al.* 2012)

**Capítulo 1 – Quantificação de prolina e análise de germinação
em plantas de tabaco com o gene *RcDREB1***

Revisão bibliográfica

Estresse hídrico

Estresses abióticos são estresses causados por condições ambientais, como por exemplo: altas temperaturas, excesso de salinidade, luminosidade e falta de água (estresse hídrico) (Mizoi *et al.* 2012).

Entre os estresses abióticos, o estresse hídrico é o que causa maiores danos às culturas comerciais (Wang *et al.* 2017). De forma geral o estresse hídrico ocorre quando a disponibilidade de água no solo é reduzida e as condições atmosféricas causam uma perda de água contínua via transpiração ou evaporação (Jaleel *et al.* 2009).

A água é de importância fundamental para a vida, pois constitui a matriz onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos que são essenciais. Além disso, as estruturas e funções das proteínas dependem da presença de água (Reddy *et al.* 2004).

Em plantas terrestres, existe um contínuo fluxo de absorção de água do solo e perda para a atmosfera (transpiração), esse movimento ocorre por difusão, entre as células vegetais, assim como por transporte em massa através do xilema. O estresse hídrico pode causar uma embolia (uma bolha de ar dentro do xilema que interrompe o fluxo hídrico) que ocorre quando a pressão osmótica dentro do xilema atinge um potencial hídrico muito baixo e acaba forçando a entrada de ar podendo levar a planta a morte (Brodersen e McElrone 2013; Martínez-Vilalta e Garcia-Forner 2017).

O primeiro sinal visual de estresse hídrico nas plantas ocorre quando o turgor foliar é reduzido (as folhas murcham), logo a sinalização química de estresse hídrico é enviada e o ácido abscísico (ABA) leva ao fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água (Knight e Knight 2001). Ao fechar os estômatos, a entrada de CO₂ é reduzida comprometendo todo processo da fotossíntese (Reddy *et al.* 2004).

O ácido abscísico é um hormônio vegetal que tem função de defesa contra estresses abióticos e bióticos, ativando vários mecanismos fisiológicos (Vishwakarma *et al.* 2017).

Outra função do ABA é o acúmulo de prolina nos vacúolos das células. Esse acúmulo ocorre durante o estresse hídrico e tem como função a regulação osmótica, assim a prolina tem um papel como reguladora e como indicativo de que a planta está respondendo ao estresse (Fu *et al.* 2018).

Prolina é um aminoácido presente em praticamente todos os seres vivos com função de proteção durante estresses abióticos (Jangra *et al.* 2017). A prolina é acumulada em vários organismos como protozoários, invertebrados marinhos e plantas após algum tipo de estresse (Hare e Cress 1997). Em plantas, foi relatado o acúmulo de prolina após estresse salino, hídrico, por altas e baixas temperaturas, por metais pesados, além de infecções por patógenos e deficiência nutricional. A quantidade de prolina pode variar em cada espécie e pode ser elevada em até 100 vezes em períodos de estresse (Verbruggen e Hermans 2008).

Outra função da prolina é estabilizar a estrutura das chaperonas (proteínas que auxiliam no enovelamento de outras proteínas) agindo como um tampão no citosol e balanceando as reações de oxirredução (Maggio *et al.* 2002; Kang *et al.* 2013).

O estresse hídrico é um dos maiores problemas para a estabilidade e crescimento da oferta de alimento global (Dwivedi *et al.* 2017). Os modelos climáticos apontam uma mudança no padrão de precipitações, assim como maiores e mais frequentes períodos de estiagens oriundas do aquecimento global (Bates *et al.* 2008).

Apesar das alterações climáticas, as plantas naturalmente têm a capacidade de suportar ambientes desfavoráveis (Hassan *et al.* 2015). Plantas de climas mais áridos vêm sendo selecionadas através da seleção natural para sobreviver nessas regiões possuindo estratégias e genes que conferem tolerância a esses ambientes (Khedr *et al.* 2011; Mizoi *et al.* 2012).

Essas estratégias de defesa podem ser inicialmente divididas em três: (I) fuga da seca - onde a planta tem um ciclo de vida curto e lança sementes no início da época de estiagem; (II) a antecipação à seca - fechamento estomático, maior investimento na formação de raízes, aumento da síntese de ABA e redução na fotossíntese; (III) a tolerância à seca - ajustes metabólicos, acúmulo de osmorreguladores e acúmulo de proteínas que protegem a planta em períodos de seca (Osmolovskaya *et al.* 2018; Manavalan *et al.* 2009).

As estratégias de proteção contra o estresse abiótico têm sua base em genes. Portanto o estudo desses genes relacionados à tolerância é fundamental para os programas de engenharia genética que objetivam o melhoramento de cultivares comerciais (Chen *et al.* 2009; Janiak *et al.* 2016).

Genes de tolerância a estresse hídrico podem ser inicialmente divididos em dois tipos: (I) genes que codificam proteínas funcionais que atuam diretamente no estresse hídrico como: proteínas osmorreguladoras, chaperonas, enzimas chave de proteínas de membrana, proteínas transportadoras de açúcar e prolina; e (II) genes codificam proteínas reguladoras como: fatores de transcrição, proteínas sinalizadoras, fosfatases e quinases (Agarwal *et al.* 2006; Manavalan *et al.* 2009; Engels *et al.* 2017).

Plantas transgênicas com tolerância a estresse hídrico

Até 2019, somente três plantas transgênicas tolerantes a estresse hídrico haviam sido aprovadas para a comercialização: milho, soja e cana-de-açúcar (ISAAA 2020).

O milho transgênico DroughtGard™ foi desenvolvido pela Monsanto contendo o gene *cspB* (cold shock protein B) oriundo da bactéria (*Bacillus subtilis*) (Nemali *et al.* 2015). A proteína CspB contém um RNA ligado ao seu domínio que age como um tipo de chaperona, e tem como função reduzir a transcrição em momentos de estresses. Somente em períodos de estresse as plantas MON 87460 mostram maior produtividade do que as plantas não transgênicas, chegando a produzir 6% a mais de grãos em condições com a irrigação limitada (Nemali *et al.* 2015). O milho transgênico foi inicialmente plantado em 2013 nos Estados Unidos em uma área de 50.000 hectares, no ano seguinte foram plantados 275.000 hectares e em 2015, uma área de 810.000 hectares. Esse aumento na área plantada se deu pela grande aceitação da tecnologia pelos agricultores (Nemali *et al.* 2015; James 2015; Jiang *et al.* 2016; ISAAA 2020).

Na Argentina foi gerada a soja HB4® tolerante ao estresse hídrico pela empresa Verdeca. A soja produzida possui o gene *hahb-4*, originário de girassol, é um fator de transcrição da família HD-Zip. A expressão do gene é

regulada por ABA e estresse hídrico, quando superexpressado em *Arabidopsis thaliana* as plantas apresentaram uma forte tolerância ao estresse hídrico (Manavalan *et al.* 2009).

A cana-de-açúcar tolerante foi produzida pela Persero e liberada comercialmente em 2013, inicialmente na Indonésia. As canas-de-açúcar transgênicas possuem os genes *EcBetA* e *RmBetA* que tem uma função de proteção osmótica em eventos distintos (James 2015; ISAAA, 2020).

Outras *commodities* como, por exemplo, o algodão vem sendo foco de pesquisas com o intuito de avaliar a função de genes de tolerância à seca tanto em plantas modelo como no próprio algodão. Um exemplo é o gene *GhNAC2* que ao ser superexpressado em *Arabidopsis* e algodão aumentou o crescimento das raízes (Gunapati *et al.* 2016).

Genes *DREB* e plantas

DREB (dehydration responsive element binding) é uma família gênica de fatores de transcrição induzidos por estresses bióticos e, principalmente por estresses abióticos. Inicialmente, foi descoberta em *Arabidopsis* com o gene *DREB1A*, posteriormente foi observada em poaceas como arroz (*OsDREB1B*), trigo (*TaDREB2*) e capim-búfalo (*BdDREB2*), e em outras espécies como soja (*GmDREB1*), batata (*StDREB1*) e em mamona (*RcDREB1*) (Gutha e Reddy 2008; Morran *et al.* 2011; Bouaziz *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014; Jiang *et al.* 2017).

A família *DREB* pertence à superfamília AP2/ERF. A família *DREB* é subdividida em seis grupos (*DREB-A1* a *A6*). Essa classificação é baseada na similaridade das sequências de cada gene e também na função de cada grupo (Agarwal *et al.* 2006; Mizoi *et al.* 2012).

Em alguns trabalhos onde os genes *DREB* foram expressos constitutivamente sobre o controle do promotor 35S CaMV foi observado um fenótipo anão nas plantas. Esse fenótipo anão é relacionado ao gene *Tolerance Zinc Finger (STZ)* que ao ser super-induzido pela expressão constitutiva dos fatores de transcrição *DREBA1* causam uma interrupção na

rota de síntese de giberelina (fitohormônio relacionado ao alongamento celular) (Knight e Knight 2001; Cong *et al.* 2008; Mizoi *et al.* 2012).

RcDREB1

RcDREB1 é um fator de transcrição de mamona (*Ricinus communis*) que codifica para uma proteína que pertence a superfamília AP2/ERF e família CBF/DREB. As proteínas pertencentes à superfamília AP2/ERF possuem um domínio de 60 a 70 aminoácidos altamente conservados (uma sequência de alta importância que se liga a promotores) que confere tolerância a diversos tipos de estresse (Dietz *et al.* 2010).

Em 2013, Cipriano *et al.* caracterizaram o promotor do gene *RcDREB1* de mamona (*Ricinus communis* L.) regulando a expressão do gene *gus* em plantas de tabaco. Sua expressão foi analisada em sementes, folhas, flores e caule de plantas de tabaco submetidas a diversos estresses abióticos como: frio, estresse salino, e estresse hídrico, porém apenas foi observada a expressão do gene *gus* em grãos de pólen durante a antese. Além disso, em plantas de mamona, a expressão de *RcDREB1* também foi observada apenas em pólen no momento da antese (Cipriano *et al.* 2013).

Diante destas observações, a função biológica inferida da expressão específica do gene *RcDREB1* pode estar relacionada tanto ao desenvolvimento dos pólenes quanto a um mecanismo de proteção a fatores ambientais. Vale ressaltar que a mamona é uma planta adaptada a regiões semiáridas com altas temperaturas. Além disso, as flores masculinas de mamoneira são separadas das flores femininas (diclino-monóicas), sendo necessário que o pólen seja disperso para que ocorra a fecundação que ocorre com alta frequência de polinização cruzada (acima de 50%) (Rana *et al.* 2012). Dessa forma, é possível que nessa espécie haja mecanismos de proteção a estresses ambientais que evitem a redução da viabilidade do pólen (Cipriano *et al.* 2013).

O gene *RcDREB1* vem sendo estudado no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a Agricultura Tropical (LEG) em plantas transgênicas de tabaco onde expresso sob domínio de um promotor constitutivo 35S CaMV para avaliar sua expressão e função nas plantas inteiras durante o estresse

hídrico e em grãos de pólen. As plantas transgênicas de tabaco geradas expressando o gene *RcDREB1* de forma constitutiva apresentaram maior viabilidade dos grãos de pólen quando comparados com as plantas de tabaco não transgênicas (Rego 2015).

Nesse trabalho cinco linhagens de plantas transgênicas contendo o gene *RcDREB1* foram testadas para tolerância a estresse hídrico, onde a rega das plantas foi removida por nove dias. Analisando os parâmetros individuais observados com o IRGA, a taxa de fotossíntese apresentou menor redução nas linhagens transgênicas, a transpiração nas plantas transgênicas também foi menor, e a condutância estomática se mostrou diferente apenas na linhagem P6, sendo maior que na linhagem WT. Na avaliação da viabilidade do pólen a linhagem P11 apresentou viabilidade estatisticamente maior que a linhagem WT. Os resultados indicaram que todas as linhagens transgênicas testadas apresentaram tolerância ao estresse hídrico, assim como um ganho de biomassa durante o período do estresse avaliado em comparação com as plantas WT. Adicionalmente, a linhagem P17 se mostrou superior entre as linhagens transgênicas ao observar o acúmulo de biomassa. (Rego 2015).

Com os resultados obtidos, o gene *RcDREB1* se mostrou um candidato a programas de melhoramento de cultivares comerciais. Porém, faz-se necessária a continuação do trabalho com a avaliação da variação de prolina durante o período de estresse hídrico e o efeito do ABA em plantas contendo o gene *RcDREB1*.

Justificativa

O gene *RcDREB1* ao ser expresso em plantas de tabaco mostrou não somente uma maior tolerância ao estresse hídrico quando comparado com as plantas não transgênicas, como também um maior crescimento durante o período de estresse. Com o intuito de melhor compreender a forma de ação do gene *RcDREB1* novos estudos devem ser realizados como avaliar a variação de prolina durante o período de estresse hídrico assim como a influencia do ABA em plantas com o gene *RcDREB1*.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliação da resposta fisiológica de planta modelo *Nicotiana tabacum* quando expresso o gene *RcDREB1* constitutivamente.

Objetivos específicos

- Quantificar prolina em linhagens de tabaco geneticamente modificadas contendo o gene *RcDREB1* submetidas a um período de estresse hídrico
- Avaliar a germinação de sementes de tabaco transgênicas contendo o gene *RcDREB1* sob diferentes tipos de estresses.

Material e Métodos

O trabalho em geral foi realizado no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG), a liofilização foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCTV II), ambos laboratórios localizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). A quantificação de prolina foi realizada no Laboratório de Bioquímica Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília campus Darci Ribeiro.

Extração e quantificação de prolina

As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizadas na quantificação de prolina foram as plantas transgênicas geradas em trabalho anterior (Rego 2015). Essas foram submetidas a um estresse hídrico por um período de nove dias e a cada três dias foram retiradas folhas para realizar a quantificação de prolina (Rego 2015). As folhas retiradas foram, preferencialmente, a terceira após as cotiledonares. Foram utilizadas 10 plantas transgênicas de cada linhagem transgênica e 10 plantas não transgênicas (Wild Type - WT).

Para a extração de prolina, as folhas de tabaco foram liofilizadas e 1 g de folha foi macerado em um moinho de bolas. A extração foi realizada utilizando 10 mg do material macerado que foi transferido para um microtubo de 2 mL contendo 500 µL de etanol 80% (v/v) e colocado em banho-maria a 80 °C por 20 min. Em sequência, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. e a fase etanólica foi transferida para um novo microtubo. A extração etanólica foi repetida três vezes.

Para a quantificação de prolina, foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde cada poço continha 50 µL das amostras em extrato etanólico, 50 µL de tampão citrato 1 M com 0,2% (p/v) de ácido ascórbico e 100 µL de solução de ninidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v), foram feitas triplicatas de todas as amostras. As microplacas foram aquecidas a 80 °C por 30 min e resfriadas à temperatura ambiente por 5 min. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190) com o comprimento de onda de 570 nm. A curva padrão de prolina (Sigma aldrich) foi

confeccionada a partir de uma solução de 1 mM [diluída em etanol 80% (v/v)] na quantidade crescente de 0µL, 8µL, 20µL, 40µL, 80µL, 120µL, 160µL e 200µL. Dessa forma a curva ficou com as concentrações finais de 0 mM, 0,04 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, e 1 mM de prolina, respectivamente. Os valores obtidos nas amostras que excederam o ponto máximo da curva foram repetidos diluindo a amostra (1:1).

Teste de germinação com estresse por NaCl, Manitol e ABA

Sementes da geração F2 das linhagens de tabaco transgênico foram utilizadas em ensaio para avaliar a germinação sob três diferentes tratamentos com três concentrações cada, exceto manitol que foi utilizada apenas uma concentração, e um controle. Para o ensaio foi utilizado meio MS (Murashige and Skoog Basal Medium – Sigma) com sacarose 2% (p/v), MES 3 mM e ágar 0,8% (p/v), acrescido de ABA (ácido abscísico), ou NaCl (cloreto de sódio) ou manitol de acordo com as concentrações na Tabela 1. Foram utilizadas 4 placas de Petri (com 9 cm de diâmetro) por linhagem em cada concentração e em cada placa foram inseridas 10 sementes. As sementes foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 25 °C ±2 °C.

Tabela 1 Concentração de ABA, NaCl e Manitol por meio de germinação.

	ABA (µg.L⁻¹)	NaCl (mM)	Manitol (mM)
	5	25	200
Concentração	10	50	
	20	75	

Os experimentos foram avaliados diariamente durante 15 dias, sempre no mesmo horário, contabilizando o número de sementes germinadas. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram a radícula.

As análises dos testes de germinação foram feitas de duas formas: (I) avaliação diária de germinação; (II) avaliação total de sementes germinadas no final do experimento.

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o software Prisma 5.0d para Mac OS X e foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características.

Resultados

Quantificação de prolina

A análise da quantidade de prolina nas plantas transgênicas sob estresse indica que as plantas transgênicas possuem maior quantidade de prolina no início do período de estresse hídrico do que as plantas não transgênicas (Figura 1). À medida que o período de estresse hídrico aumenta, as linhagens transgênicas apresentam um menor acúmulo de prolina que pode ser observado com o Δ (acúmulo de prolina ao longo do tempo) ao final do teste as plantas WT apresentaram uma maior quantidade de prolina sendo estatisticamente diferente das plantas transgênicas (Figura 1).

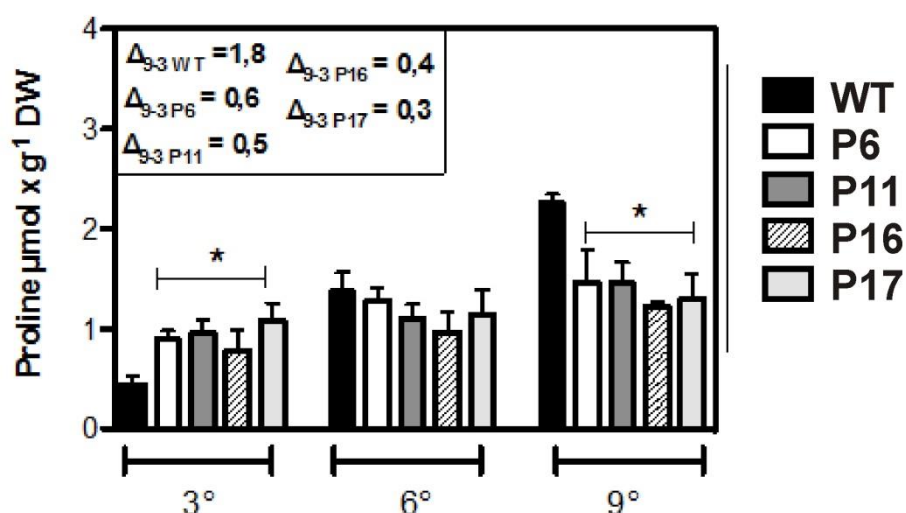


Figura 1 Concentração de prolina durante o período do teste de seca em plantas de tabaco. WT plantas de tabaco não transgênicas: P6, P11, P16, P17 linhagens de tabaco transgênicas. O asterisco representam diferenças significativas pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$)

Teste de germinação com ABA, NaCl e Manitol

Germinação ao longo do tempo

As sementes transgênicas de tabaco e WT em meio controle tiveram o início da germinação no 5º dia e atingiram o máximo de germinação entre o 10º e o 12º dia de forma que a linha do gráfico estabiliza. A linhagem WT

apresentou germinação de 60% das sementes levemente abaixo das linhagens transgênicas, sendo que a linhagem P17 teve a maior germinação com quase 100% (Figura 2A).

Com $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ABA o início da germinação passou para o 7º dia, sendo que nas linhagens P6 e WT somente se iniciou no 9º dia, a linhagem WT ainda obteve 60% de germinação, À linhagem P6 teve uma germinação abaixo de 40% sendo a linhagem transgênica com a menor germinação. As linhagens P17 e a P11 apresentaram germinação próxima a 80% as maiores nesse tratamento (Figura 2C).

Em meio de cultura com a concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ABA somente a linhagem P11 teve o início da germinação no 7º dia, as demais linhagens começaram a germinar no 9º dia, a linhagem WT apresentou uma germinação acima de 40%, a linhagem P11 apresentou uma germinação próxima a 60% e P17 atingiu 70% de germinação (Figura 2E).

Utilizando a concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ABA as sementes apresentaram a maior parte da germinação no 11º dia, a linhagem WT e P16 apresentaram germinação próxima a 20%, a linhagem P6 germinou menos que 10% e a linhagens P11 e P17 apresentaram uma germinação próxima a 40% (Figura 2G).

A taxa de germinação em 25 mM de NaCl apresentou padrão similar as sementes no controle, com a germinação iniciando entre o 5º e o 7º dia e uma estabilização próxima ao 10º dia de experimento, as linhagens P11 e P17 iniciaram a germinação no 5º dia com uma taxa final de germinação de 85 e 75% respectivamente, sendo que as demais linhagens iniciaram a germinação no 7º dia (Figura 2D).

Utilizando 50 mM de NaCl a germinação iniciou no 6º dia nas linhagens P11 e P17, ao 7º dia nas linhagens WT e P6 e ao 9º dia na linhagem P16. A linhagem P17 apresentou 70% de germinação, para as linhagens WT e P11 a taxa de germinação foi próximas a 60%; a linhagem P6 apresentou uma germinação de 40% e na linhagem P16 foi observada a germinação próxima a 20% (Figura 2F).

Na concentração de 75 mM de NaCl novamente as linhagens P11 e P17 apresentaram as maiores taxas de germinação com o início da germinação no 5º dia e estabilizando a taxa de germinação no 12º, a linhagem P17 apresentou

80% de germinação seguida pela linhagem P11 com uma germinação próxima a 75%, as linhagens P16 e WT tiveram uma germinação próxima a 60% e a linhagem P6 apresentou uma germinação próxima a 30% (Figura 2H).

As sementes no tratamento com 200 mM de manitol apresentaram a maior parte da germinação a partir do 7º dia, além disso as linhagens P11 e P17 apresentaram as maiores taxas de germinação com a estabilização da germinação no gráfico ao 12º dia. A linhagem P17 apresentou germinação próxima a 80%, as linhagens WT, P11 e P16 apresentaram germinação entre 45% e 55% e na linhagem P6 foi observada uma germinação próxima a 30% (Figura 2B).

De forma geral as linhagens P11 e P17 apresentaram maiores taxa de germinação durante todo o experimento. A linhagem P6 apresentou a menor taxa de germinação entre as linhagens transgênicas, onde foi observada uma germinação menor que na linhagem WT. A linhagem P16 não apresentou grande destaque ficando na média das linhagens transgênicas.

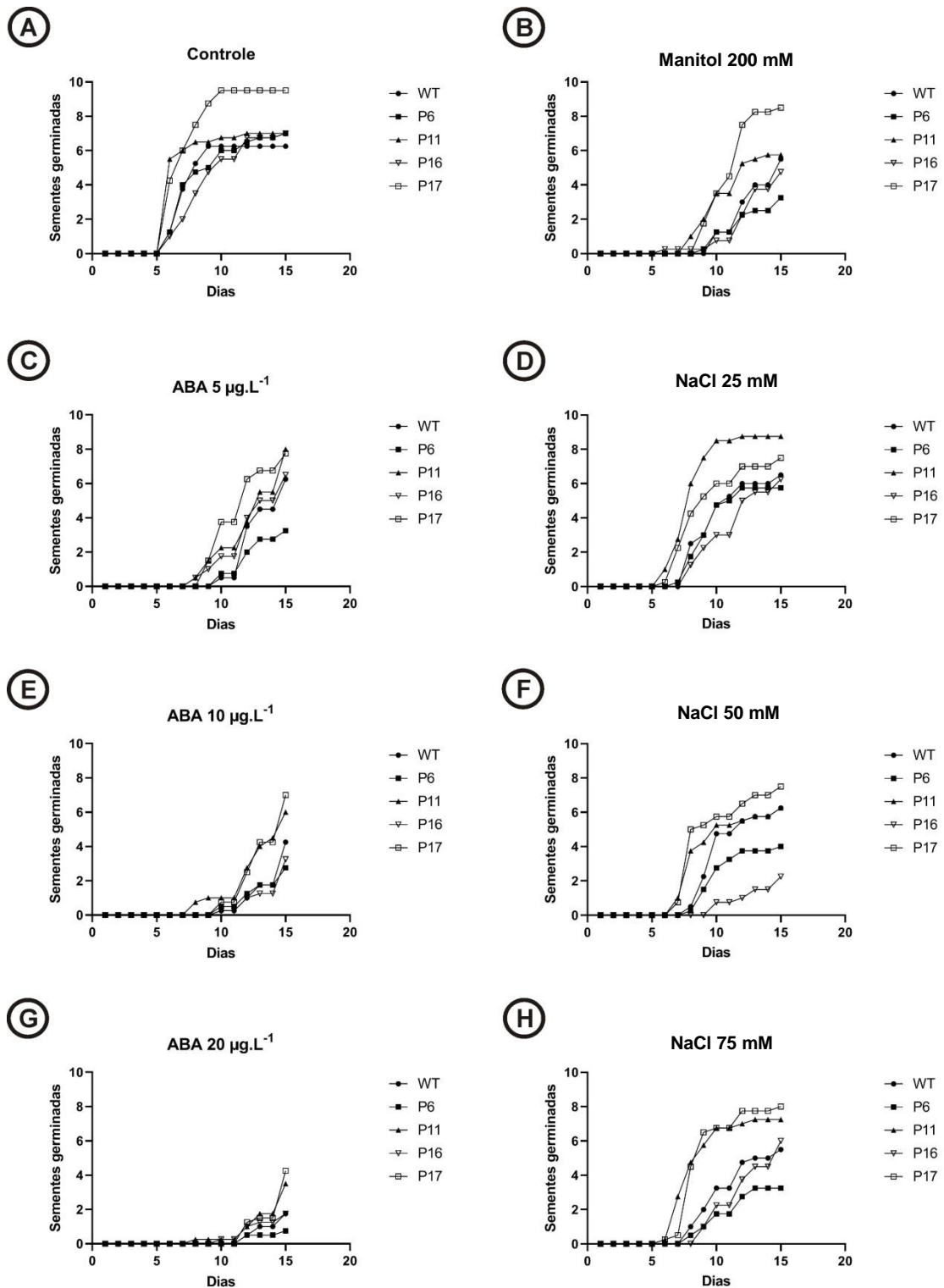


Figura 2 Germinação de tabaco em meio MS, ABA NaCl e Manitol; (A) Controle; (B) Manitol 200 mM; (C) ABA 5 µg.L⁻¹; (D) NaCl 25 mM; (E) ABA 10 µg.L⁻¹; (F) NaCl 50 mM; (G) 20 µg.L⁻¹; (H) NaCl 75 mM.

Germinação comparativa

Para a análise de germinação comparativa a quantidade máxima de sementes WT germinadas em meio controle foi considerada 100%. Assim as linhagens transgênicas que apresentaram uma germinação maior que o meio controle atingiram uma porcentagem maior que 100%.

Nas condições controle as sementes de tabaco com o gene *RcDREB1* apresentaram uma germinação maior que as plantas WT (Figura 3A).

Na concentração de 75 mM de NaCl, as plantas transgênicas apresentaram uma germinação de 100%, sendo que as linhagens P11 e P17 apresentaram uma germinação maior comparadas com as plantas controle (Figura 3 A).

Com 200 mM de manitol a linhagem WT apresentou uma queda na taxa de germinação, assim como com 75 mM de NaCl. Essa queda não foi observada nas linhagens transgênicas com manitol, sendo que a linhagem P17 apresentou uma taxa de germinação maior que as demais (Figura 3 A).

Com 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ABA a linhagem WT apresentou uma taxa de germinação similar a do tratamento controle (sem ABA), a linhagem P6 apresentou uma germinação similar a WT e as demais linhagens apresentaram uma taxa de germinação estatisticamente divergente das linhagens WT e P6 (Figura 3B).

Ao elevar a concentração de ABA para 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a linhagem WT apresentou uma redução ainda maior na taxa de germinação enquanto as linhagem transgênicas apresentam uma menor germinação porém ficando próxima a 100% do tratamento controle sendo todas estaticamente diferentes da linhagem WT (Figura 3B).

A concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ABA reduziu a taxa de germinação de todas as linhagens, e a linhagem WT apresentou a menor taxa de germinação (abaixo de 25%) as linhagens transgênicas apresentaram uma taxa de germinação menos homogênea com a linhagem P11 e P17 com as maiores taxas de germinação (Figura 3B).

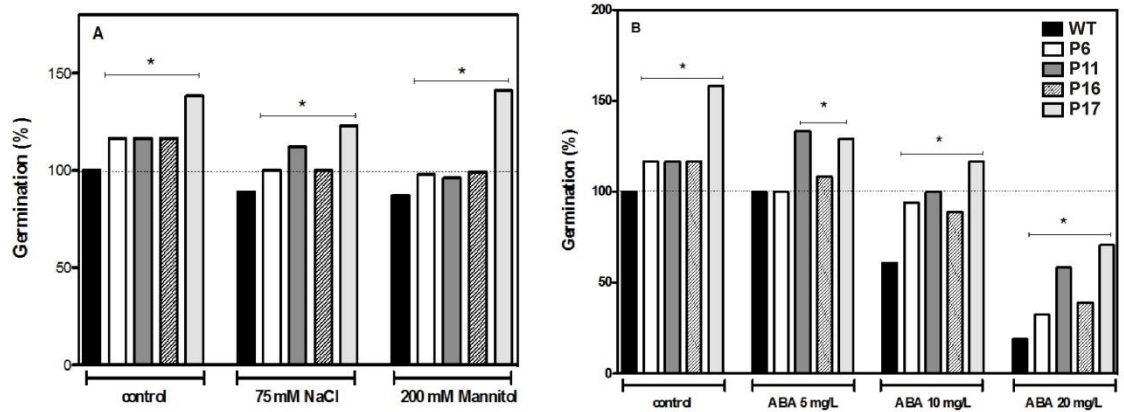


Figura 3 Germinação total de tabaco: A) Meio Controle, Meio NaCl 75 mM Meio Manitol 200 mM;. B) Meio controle, ABA 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ABA 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ABA 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O asterisco representam diferenças significativas pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$).

Discussão

Acumular prolina é uma resposta fisiológica à desidratação em tecidos vegetativos em estádios de maturação de sementes e pólen (Hare e Cress 1997; Chibi *et al.* 1995), ou seja, a prolina vem sendo correlacionada à tolerância ao estresse hídrico como um marcador (Verbruggen e Hermans 2008).

Em trabalho anterior com as mesmas plantas de tabaco foi observado um maior crescimento vegetativo durante o período de estresse hídrico e uma maior eficiência no uso da água (Rego 2015). De acordo com os resultados da quantificação de prolina nessas plantas de tabaco, as linhagens transgênicas já possuem inicialmente uma quantidade maior de prolina que as plantas WT, porém o acúmulo de prolina ao longo do período de estresse foi menor que nas plantas WT. No entanto a maior concentração de prolina nas plantas WT durante o estresse não foi o suficiente para conferir tolerância a estresse por seca, portanto a tolerância a seca provavelmente não está relacionada a concentração de prolina (Rego 2015).

Os genes *DREB* têm três rotas conhecidas de ação independentes: uma por frio; uma ativada por ABA; e uma ativada por seca e salinidade (Knight *et al.*, 2001), ou seja, os genes *DREB* têm mais de uma forma de ação. Cipriano *et al.* (2013) em um trabalho com o promotor do gene *RcDREB1* observou *in silico* que o promotor possui um domínio ligado ao ABA. Contudo, não foi observada atividade do promotor ao ser induzido por ABA, o que sugere que o domínio não é suficiente para que o gene seja relacionado ao ABA. Outros trabalhos com genes *DREB* da subfamília A-5 apresentaram resultados variados, por exemplo o promotor do gene *DREB* de soja *GmDREB3* foi ativado com estresse por frio e não respondendo ao ABA (Chen, *et al.* 2009). O gene *GmDREB2* também de soja, tem sua rota de ação associada ao ABA o que mostra que a subfamília A-5 não tem um padrão de ação claro e bem definido (Chen *et al.* 2007; Chen, *et al.* 2009). O gene *StDREB2* de batata também pertence a subfamília DREB A-5 e, assim como o gene *GmDREB2*, apresentou uma ligação com o ABA e um maior acúmulo de prolina durante o período de estresse (Bouaziz *et al.* 2012).

Foi observado uma ligeira insensibilidade ao ABA na repressão da germinação, comparando com a linhagem WT, durante os estresses osmóticos avaliados e durante os tratamentos exógenos com ABA. Porém os resultados não são suficientes para afirmar se o gene *RcDREB1* tem seu modo de ação dependente do ABA durante o estresse hídrico.

O ABA também está relacionado com o fechamento estomático. Em trabalho anterior foi observada à redução mais gradual no fechamento dos estômatos dessas plantas transgênicas contendo o gene *RcDREB1*. Pode também ser explicada por uma insensibilidade ao hormônio ou mesmo pelo estado hídrico superior dessas plantas que contribuiu para menor inibição do crescimento da parte aérea em resposta ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram observados por Upadhyay *et al.* (2017) no qual a redução na sensibilidade ao ABA foi observado em plantas que superexpressaram o gene *SIDREB3*. Essas plantas apresentam igualmente maior condutância estomática e maior taxa de fotossíntese durante o estresse hídrico (Upadhyay *et al.* 2017).

As plantas transgênicas contendo o gene *RcDREB1* apresentam uma resposta variada ao estresse salino, dentre elas as linhagens P17 e P11 se destacaram apresentando maior germinação comparadas as sementes controle em todas as concentrações de NaCl, o que indica uma maior tolerância ao estresse salino. Liu *et al.* (1998) observaram a expressão do gene *DREB2A* em *Arabidopsis* quando submetida a estresse por seca e por salinidade. Cong *et al.* (2008) transformaram tabaco para avaliar a tolerância concedida pelo gene *DREB1A* a estresse salino onde as sementes foram transferidas após a germinação, observaram que mesmo com uma concentração de 300 mM de NaCl as plântulas transgênicas apresentaram uma menor perda de clorofila (46%) quando comparadas com as plantas WT (74%) que perderam mais clorofila, se mostrando tolerantes ao estresse salino. Chen *et al.* em 2009, geraram plantas de *Arabidopsis* contendo o gene *GmDREB3*, também da família DREB A-5, e assim como com o gene *DREB1A* as plantas apresentaram maior tolerância a estresse salino.

As sementes transgênicas da linhagem P17 apresentaram as maiores taxas de germinação na concentração de 200 mM manitol comparadas com a linhagem WT, com 80 e 58% de germinação respectivamente, o que sugere

uma maior tolerância das plantas transgênicas ao estresse osmótico. Gutha *et al.* (2008) ao estudar o gene *OsDREB1B*, também em tabaco e com a mesma concentração de manitol, observaram taxas de germinação entre 40% e 85% enquanto as plantas WT somente 5%.

Capítulo 2 - Introdução do gene *RcDREB1* em soja (*Glycine max* L.)

Revisão bibliográfica

Soja

A soja (*Glycine max* L.) pertence à família Fabaceae, possui importância por seu papel como fixadora de nitrogênio (realizado através da simbiose com outros micro-organismos). Assim como na alimentação humana, como óleo e fonte de proteína, em ração para animais e também na produção de biocombustíveis (Manavalan *et al.* 2009).

A domesticação da soja possivelmente iniciou-se no leste asiático, na China entre 3000 a 5000 anos, provavelmente durante a dinastia Zhou. Porém dados mais específicos de onde e quando ainda são debatidos com alguns registros arqueológicos que apontam para o norte da China próximo à Coreia como região provável de início de domesticação (Lee *et al.* 2011; Hymowitz 1970).

Até o início dos anos de 1920, os principais produtores de soja eram China, Coreia e Japão. Durante os anos de 1920 a 1940, foi iniciado o processo de melhoramento de soja nos Estados Unidos e assim foram desenvolvidas cultivares melhor adaptadas as necessidades e condições da nova região (Hymowitz 1990).

As primeiras citações do cultivo de soja no Brasil ocorreram em 1882 com alguns testes na Bahia. Porém, a primeira citação oficial de estatística de produção aconteceu em 1941 no estado do Rio Grande do Sul e em 1945, no estado de São Paulo (Bonato e Bonato 1987).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, atrás somente dos Estados Unidos (FAO 2018; CONAB 2018). A estimativa da próxima safra é de 117 milhões de toneladas, o que seria uma safra recorde, devido ao emprego de novas tecnologias no campo e com o auxílio de uma boa precipitação e temperatura presente em todo o Brasil com exceção da região sul (CONAB 2018).

Apesar da produção recorde, o cultivo de soja sofre com estiagem e a má distribuição de chuvas, tendo maior sensibilidade ao estresse hídrico durante o período de floração e pós-floração (Oya *et al.* 2004). A estiagem

durante essas fases causa o abortamento das flores e vagens sendo um motivo de perda de produção (Meckel *et al.* 1984; Manavalan *et al.* 2009).

A proteção natural ao estresse hídrico em soja foi estudada em vários estádios da planta. Nas raízes foi observado o maior crescimento da raiz principal durante o período de estresse o que permite a planta alcançar zonas mais profundas onde pode haver água (Manavalan *et al.* 2009). Dessa forma, plantas de soja que têm um rápido crescimento da raiz principal previamente ao estresse teriam maior tolerância durante períodos de estresse hídrico (Kaspar *et al.* 1984). Assim como plantas com folhas menores teriam menor perda de água para o ambiente através da transpiração (Huck *et al.* 1983; Sinclair e Serraj 1995).

Os mecanismos de tolerância à seca existentes na natureza não refletem, necessariamente, em plantas com maior produção por hectare, pois plantas que gastam mais energia para o desenvolvimento de raiz levam mais tempo para chegar ao período de floração. Assim como plantas com folhas menores tem menor capacidade fotossintética, o que reduz diretamente no tamanho do grão produzido. Dessa forma para a agricultura o desejável são plantas que mantem a produção com o mínimo de redução na produtividade possível (Manavalan *et al.* 2009).

Outra estratégia adotada pelas plantas, inclusive pela soja, é adaptar o ciclo de vida ao calendário anual de chuvas, o que pode, em alguns casos, encurtar o ciclo de vida da planta ou prorrogar algum estádio (Osmolovskaya *et al.* 2018). Contudo, os ciclos anuais têm pequenas variações, pois os ciclos de chuva variam naturalmente e podem causar um atraso na data de plantio, e conseqüentemente, o atraso de outras culturas que seriam plantadas após a colheita da soja (He *et al.* 2017; CONAB 2018).

Como várias outras plantas, a soja também possui genes da família DREB como os genes *GmDREB1*, *GmDREB2* e *GmDREB3*, dentre outros (Chen *et al.* 2007; Chen *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2017). Esses genes foram classificados na subfamília A-5 e estudados em outras plantas como, por exemplo o gene *GmDREB1* foi avaliado em trigo e os resultados apontaram para uma função na regulação de estresses oxidativo e osmótico (Jiang *et al.* 2016).

Transformação genética de soja por *Agrobacterium tumefaciens*

A fim de gerar plantas com maior tolerância ao estresse hídrico, uma possibilidade é introduzir genes através da transformação genética. O método de inserção dos transgenes pode ser de duas formas: direta como, por exemplo, usando a biobalística (Rech e Aragão 1998; Aragão e Brasileiro, 2010) ou indireta como, por exemplo, via *Agrobacterium tumefaciens* (Zeng *et al.* 2004).

As agrobactérias são capazes de transferir parte de seu próprio material genético para algumas espécies de plantas causando doenças como a galha da coroa (De Cleene e De Ley 1976). A metodologia de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* consiste em inserir transgenes nas células de interesse utilizando o próprio maquinário das linhagens de agrobactérias desarmadas (Newell 2000). De maneira simplificada, o que ocorre é que as agrobactérias presentes no solo são capazes de detectar moléculas sinais oriundas de injúria como, compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos, e, a partir disso, são atraídas (McCullen e Binns 2006). Uma vez próximas às células vegetais, as agrobactérias são capazes de infectá-las pela ativação dos genes de virulência localizados em seu plasmídeo (Ti no caso de *A. tumefaciens*). A ativação desses genes induz a transferência de parte do material genético localizado no plasmídeo Ti na região conhecida como T-DNA que será integrado no genoma da planta (Hooykaas e Schilperoort 1992; Newell 2000).

No caso das agrobactérias encontradas na natureza, os genes integrados no genoma da planta levam ao desenvolvimento de tumores causando doenças, porém, no caso da utilização dessas agrobactérias para transformação genética, seus plasmídeos Ti são desarmados, retirando-se as regiões responsáveis por causar os tumores e são inseridos os transgenes de interesse na região do T-DNA no plasmídeo Ti. Com isso, ao infectar uma planta as agrobactérias transferem os genes de interesse para o genoma da planta (Brasileiro e Aragão 2010; Pitzschke e Hirt 2010).

A transformação via *A. tumefaciens* tem sido bastante utilizada para gerar plantas de soja transgênicas, uma das vantagens é não ser requerido o

uso de equipamentos caros, além de ocorrer a inserção de baixo número de cópias e as bordas do cassete inserido serem conhecidas, o que facilita a identificação da região de inserção (Brasileiro e Aragão 2010). A transformação de soja por *A. tumefaciens* é baseada na transformação de nós cotiledonares da soja e regeneração por organogênese direta (Newell 2000; Zeng *et al.* 2004).

Em 1988, Hinchee *et al.* geraram a primeira soja transgênica via *A. tumefaciens* a partir de organogênese direta de gemas cotiledonares. A partir disso vários grupos fizeram modificações para gerar protocolos mais eficientes como a utilização do gene *bar* como gene de seleção (Zhang *et al.* 1999; Zeng *et al.* 2004) e a utilização de compostos antioxidantes (Olhoft *et al.* 2001). Além disso, como alternativa para seleção de plantas transgênicas de soja o gene de seleção *ahas* tem sido muito utilizado de forma eficiente em plantas como soja, algodão, feijão e mamona (Aragão *et al.* 2000; Aragão *et al.* 2005; Bonfim *et al.* 2007; Sousa *et al.* 2017).

Justificativa

A soja é atualmente uma das principais *commodities* produzida em várias regiões do país, e apesar da produção crescente, o cultivo de soja sofre com estiagem e a má distribuição de chuvas, comprometendo sua produtividade. A geração de plantas de soja geneticamente modificadas com o gene *RcDREB1* surge como uma alternativa para a produção de soja no Brasil em locais de baixa disponibilidade de chuvas ou períodos de seca.

Objetivos

Objetivo geral

Gerar plantas de soja (*Glycine max* L.) transgênicas expressando de forma constitutiva o gene *RcDREB1* de mamona (*Ricinus communis* L.).

Objetivos específicos

- Obter plantas de soja geneticamente modificadas via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene *RcDREB1* dirigido pelo promotor 35S CaMV;
- Avaliar a expressão do gene nas linhagens geradas;
- Avaliar a tolerância das linhagens transgênicas de soja quando submetidas ao estresse hídrico.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG) localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). Com as Cultivares BRS conquista e BRS 7980 e condições de cultivo em sala de crescimento de 25° C com fotoperíodo de 16h.

Vetores de transformação

Foram utilizados dois vetores para transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* baseados no vetor pC3300. Cada vetor contém um agente seletivo diferente: o primeiro vetor chamado de pRcDREB contendo o gene de seleção *bar*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, e o gene *RcDREB1*, ambos controlados pelo promotor 35S CaMV (Figura 4). O segundo vetor chamado de pRcDREBAHAS com o gene de seleção *ahas* que confere tolerância ao herbicida Imazapir controlado pelo promotor 35S CaMV, e o gene *RcDREB1* controlado pelo promotor AtACT2 (Figura 5).

Os vetores foram sintetizados pela empresa Epoch, e introduzidos em linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* da cepa EHA 105.

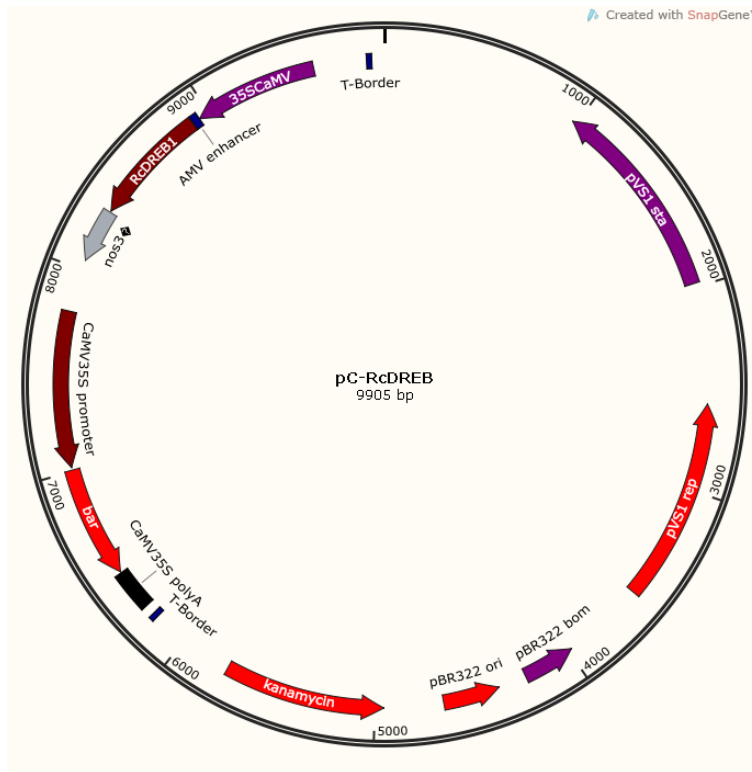


Figura 4 Vetor pRcDREB contendo o gene *RcDREB1* controlado pelo promotor 35SCaMV e o gene de seleção bar controlado pelo promotor 35SCaMV.

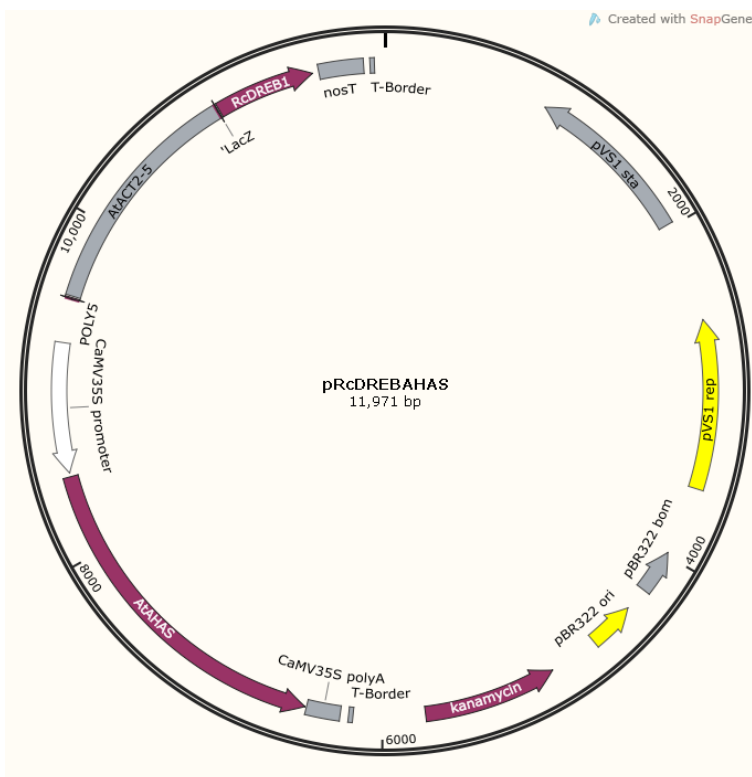


Figura 5 Vetor pRcDREBAHAS contendo o gene *RcDREB1* controlado pelo promotor AtACT2 e o gene de seleção ahas controlado pelo promotor 35SCaMV

Transformação genética de soja

Foram geradas plantas geneticamente modificadas de soja da cultivar Conquista e BRS 7980 através de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* baseada no protocolo de Zeng *et al.* 2004 com alterações.

As sementes foram desinfestadas em câmara vedada com o gás clorox, gás obtido da reação entre ácido clorídrico e hipoclorito de sódio da seguinte forma: 4 mL de ácido clorídrico 37% (v/v), 50 mL de hipoclorito de sódio 12% (v/v) e 50 mL de água destilada. As sementes ficaram na câmara por um período de 24h e, em seguida foram colocadas em meio de germinação [sais de MS, vitamina B5 1X, sacarose 2% (p/v), ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,8]. Para a transformação o explante utilizado foi os cotilédones com uma parte do hipocótilo de 5 mm. Após 7 dias, os cotilédones foram separados, as gemas já desenvolvidas foram removidas e o hipocótilo foi cortado, retirando a radícula. Os explantes passaram por uma cocultura líquida [sais de B5 1X, sacarose 3% (p/v), 6-benzilaminopurina (BAP) 1,7 mg.L⁻¹, acetoseringona 200 µM, vitamina B5 1X, ácido giberélico (GA₃) 1,7 mg.L⁻¹ com pH ajustado para 5,2] por 40 minutos, seguido de uma cocultura sólida [sais de B5 1X, sacarose 3% (p/v), BAP 1,7 mg.L⁻¹, acetoseringona 200 µM, vitamina B5 1X, GA₃ 1,7 mg.L⁻¹, ditioneitol (DTT) 1 mM, L-cisteína 3 mM, tiosulfato de sódio 1 mM, ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,2] por 5 dias a 20° C no escuro.

Após a cocultura, os explantes foram transferidos para um meio de indução de brotos [meio B5 completo 1X, sacarose 3% (p/v), BAP 1,7 mg.L⁻¹, MES 3 mM, cefotaxima 100 mg.L⁻¹, timentim 50 mg.L⁻¹, fitagel 0,3% (p/v), glifosinato de amônio 6 mg.L⁻¹ ou imazapyr 700 mM e pH ajustado para 5,7] por 30 dias. Os explantes que multibrotaram foram transferidos para o meio de alongamento [sais de MS 1X, MES 3 mM, sacarose 3%(p/v), vitaminas B5 1X, asparagina/glutamina 50 mg.L⁻¹, ácido indolacético (AIA) 0,1 mg.L⁻¹, GA₃ 0,5 mg.L⁻¹, zeatina-R 1 mg.L⁻¹, cefotaxima 100 mg.L⁻¹ e timentim 50 mg.L⁻¹, fitagel 0,3% (p/v), glifosinato de amônio 4 mg.L⁻¹ ou imazapyr 500 mM e pH ajustado para 5,7] até o surgimento de brotos com mais de 5 cm.

Os brotos com mais de 5 cm foram transferidos para meio de enraizamento [sais de MS 1X, MES 3 mM, sacarose 2% (p/v), vitaminas B5 1X,

asparagina/glutamina 50 mg.L⁻¹, ácido indolil-3-butírico (IBA) 1 mg.L⁻¹, cefotaxima 100 mg.L⁻¹, timentim 50 mg.L⁻¹, ágar 0,8% (p/v) e pH ajustado para 5,7] onde permaneceram até o surgimento das raízes.

Todos os explantes foram repicados a cada 15 dias com exceção dos explantes em meio de enraizamento, onde os explantes permaneceram até o momento da aclimatização. Explantes com raízes de, pelo menos, 3 centímetros e 2 trifólios, foram aclimatizados em copos descartáveis de 300 mL com terra vegetal e vermiculita (1:1) e um saco transparente formando uma câmara úmida em casa-de-vegetação. Uma das laterais do saco foi cortada após 3 dias e então, após 7 dias, o saco foi completamente removido.

Análises das plantas regeneradas

As plantas que regeneraram na presença dos herbicidas glufosinato de amônio ou Imazapir foram analisadas para verificar a integração do gene *RcDREB1*. Para isso foi utilizada, a técnica de PCR.

Para tanto, foram realizadas extrações de DNA através do método de CTAB (Romano 1998), um disco foliar foi retirado com o auxílio de um microtubo de centrifuga de 1,5 mL e macerado em 400 µL de solução CTAB [CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM com PVP 1% (p/v)] e incubado por 30 minutos a 65 °C. Em seguida foram adicionados 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 5 minutos a 13000 RPM. A fase aquosa (superior) foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 280 µL de álcool isopropílico e centrifugado novamente por 5 minutos a 13000 RPM; o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v). O pellet foi seco à temperatura ambiente e diluído em 20 µL de H₂O.

Com o DNA extraído a técnica de PCR foi feita com os primers para o gene *RcDREB1*, *RcDREB42F* (ACGAGGAGGAGGAGGAATAGA) e *RcDREB548R* (ACATCCGAATCTTCCGGGTC) gerando um fragmento de aproximadamente, 586 pb. Para a amplificação foi realizado um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de

desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Somente as plantas transformadas com o vetor pRcDREB foram testadas para detecção da presença de fosfinotricina acetiltransferase com o Teste Kit Trait LL (Strategic Diagnostic Inc.) após a aclimatização.

Teste de tolerância a estresse hídrico *in vivo*

Para os testes de tolerância à seca somente foram utilizadas plantas de soja Conquista da linhagem transgênica 8.4 e não transgênicas (WT). O teste de tolerância a seca foi realizado de acordo com Gutha e Reddy (2008) e Cipriano *et al.* (2013). Para os experimentos foram utilizadas plantas com 70 dias por apresentar quantidades de folhas necessárias para as avaliações. Os testes foram realizados na casa-de-vegetação 42 C localizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília-DF, as plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 7 L com Latossolo Vermelho.

Para o teste de tolerância a seca foram utilizadas 18 plantas transgênicas de soja linhagem 8.4 e 18 plantas não transgênicas (WT). As plantas foram separadas em dois grupos: o primeiro com 12 plantas que foram submetidas ao estresse hídrico por seis dias e o segundo com 6 plantas que ficaram como controle irrigado, com o cuidado de selecionar plantas similares em tamanho antes de iniciar o estresse. As plantas estavam no estágio reprodutivo R1 onde se inicia o aparecimento dos botões florais, esse estágio foi escolhido por ser o momento de maior sensibilidade a estresse hídrico para as plantas de soja.

Análise da taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração, eficiência instantânea do uso da água.

A taxa de assimilação líquida (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E_a , $\text{mmol}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram determinadas usando o analisador de gases no infravermelho (IRGA) acoplado a um sistema portátil de medição das trocas gasosas, da fabricante ADC modelo LC-Pro SD. As folhas

analisadas utilizadas foram as primeiras após os cotilédones de cada planta. A eficiência do uso da água (WUE) foi obtida dividindo a taxa de assimilação líquida pela transpiração ($WUE=A/E$). Todas as medições foram feitas pela manhã entre 8 horas e 11 horas com as seguintes configurações do equipamento: $CO_2 = 380 \mu\text{mol mol}^{-1}$; luz $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Teor relativo de água

Para análise do teor relativo de água (TRA), foram coletados quatro amostras de discos foliares com 1 cm de raio do 1º trifólio após o cotilédone a cada dois dias durante o período de estresse hídrico. Esses discos foram imediatamente pesados para obtenção o valor do peso fresco (PF). Em seguida os discos foram hidratados com água destilada em uma placa de Petri por dois dias e pesados para obtenção do peso hidratado (PH). Posteriormente os discos foram secos em estufa a 60°C até o peso estabilizar, obtendo o peso seco (PS). Para o calculo do teor relativo foi utilizada a formula: $TRA = (PF-PS)/(PH-PS)$.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Para as análises estatísticas o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 12 repetições de cada linhagem por dia de análise nos tratamentos realizados, em condições de estresse e sem estresse. Foi realizado teste t para avaliar se houve diferença estatística entre as plantas transgênicas e as plantas controle (WT). As análises foram realizadas no programa Prisma 5.0d para Mac OS X.

Resultados

Transformação de soja via *Agrobacterium tumefaciens*

Foram utilizados dois vetores para transformação genética de soja com dois agentes seletivos diferentes. O glufosinato de amônio não se mostrou uma boa opção para a seleção de soja sendo tóxico para a cultura *in vitro* meio onde muitos explantes foram perdidos durante a fase de enraizamento.

Com o vetor pRcDREB (gene seletivo *bar*) foram realizadas 18 coculturas com um total de 1684 explantes transformados, e foram regeneradas 4 plantas, sendo duas confirmadas positivas, via teste imunocromatográfico qualitativo, para a presença d gene *bar* (Tabela 2). A primeira geração (F1) destas duas plantas transgênicas foi testada por PCR (Figura 6) com os primers já descritos para o gene *RcDREB1*. Somente uma linhagem passou o transgene a para a geração F1.

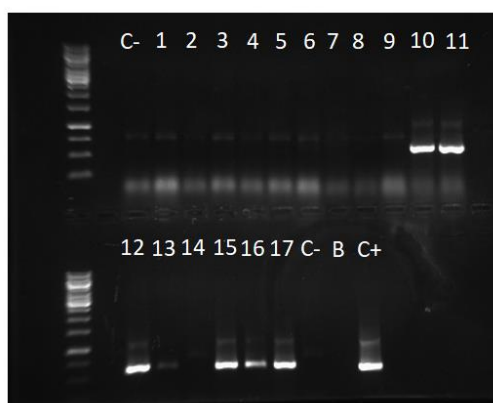


Figura 6 PCR da progênie de duas linhagens *bar* positivas. De 1 a 9: progênie da linhagem 11.11.1; de 10 a 17: progênie da linhagem 11.8.4.; C- planta não transgênica; B reação sem DNA; C+: o plasmídeo como controle positivo.

Com o vetor pRcDREBAHAS foram realizadas 3 coculturas com um total de 260 explantes transformados. Foram regeneradas 12 plantas positivas por PCR (Tabela 2), porém nenhuma passou o transgene para a progênie.

Tabela 2 Transformação genética de soja com os vetores pRcDREB e pRcDREBAHAS.

	Vetores	
	pRcDREB	pRcDREBAHAS
Plantas Transformadas	1684	260
Plantas Regeneradas	4	12
Confirmadas com PCR	2	**
Confirmadas para o <i>bar</i>	2	**

Testes de tolerância ao estresse hídrico

A taxa de assimilação líquida da linhagem WT e 8.4 foram bem próximas com exceção do 4º dia que a linhagem WT menor, porém a diferença não foi estatisticamente significativa pelo teste t (Figura 7).

(A) Taxa de Assimilação Líquida de CO₂

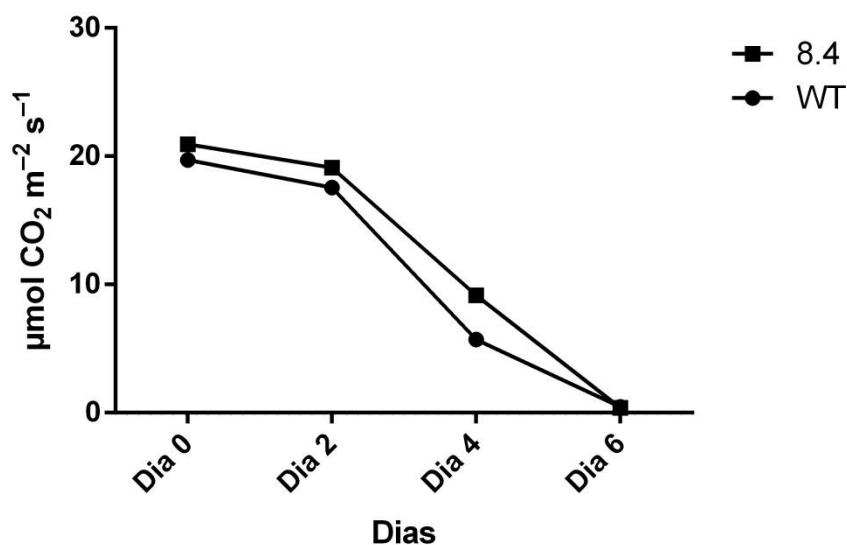


Figura 7 Taxa de assimilação líquida de CO₂ (fotossíntese), durante o período de estresse hídrico da linhagem transgênica e controle WT.

A taxa de transpiração foliar foi similar em ambas linhagens com uma maior diferença no 4º dia onde a linhagem 8.4 apresentou uma transpiração maior, porém sem diferenças estatísticas (Figura 8).

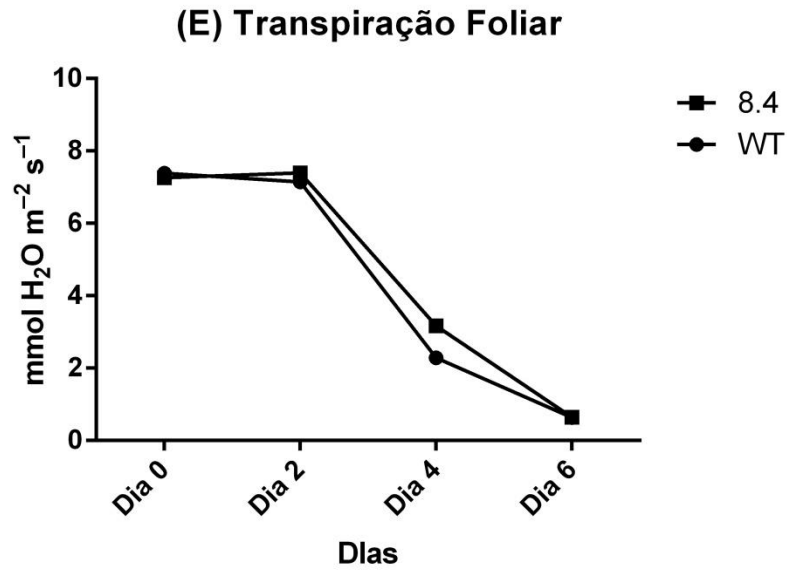


Figura 8 Transpiração foliar durante o estresse hídrico da linhagem transgênica 8.4 e do controle WT.

Considerando a condutância estomática a linhagem WT apresentou maior condutância estomática no início do estresse hídrico mas, à medida que diminuiu a disponibilidade de água, apresentou-se uma queda de condutância estomática mais acentuada quando comparada com a linhagem 8.4. Novamente, no 4º dia, as linhagens apresentavam uma diferença maior, porém essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa (Figura 9).

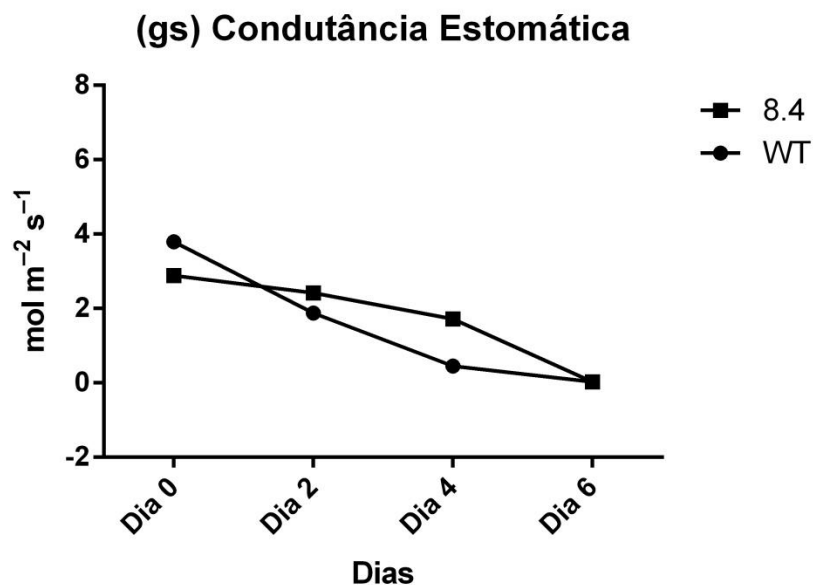


Figura 9 Condutância estomática durante um período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT.

Analisando a eficiência de uso da água as linhagens WT e 8.4 apresentaram valores muito próximos nos dias 0 e 2, ao 4º dia, a linhagem 8.4 apresentou valores similares ao 2º dia enquanto a linhagem WT apresentou uma redução no WUE, contudo ambas as linhagens atingiram valores finais similares, e o teste t não apontou diferença estatística significativa (Figura 10).

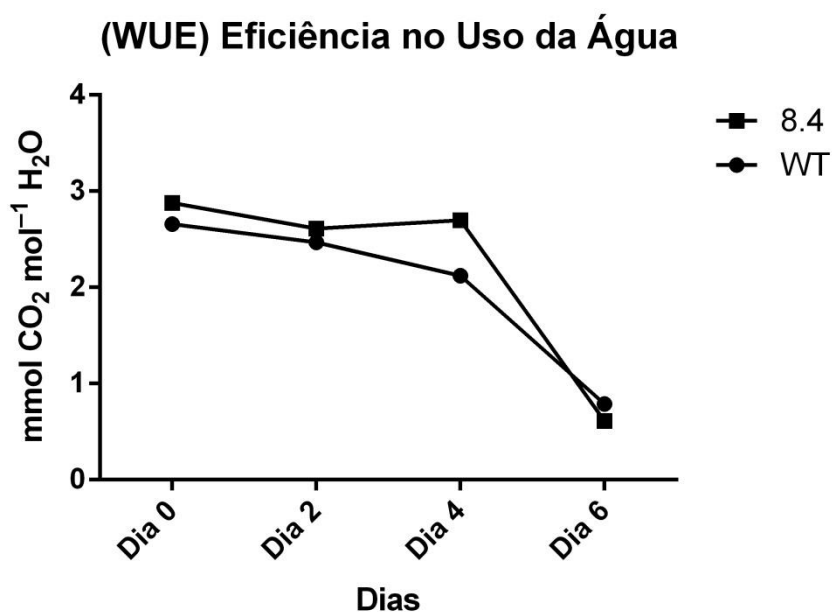


Figura 10 Eficiência no uso da água durante o período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT

As linhagens 8.4 e WT apresentaram valores muito próximos de teor relativo de água durante o período de estresse hídrico, somente sendo possível observar uma diferença no primeiro dia onde a linhagem 8.4 apresentou um maior valor (Figura 11).

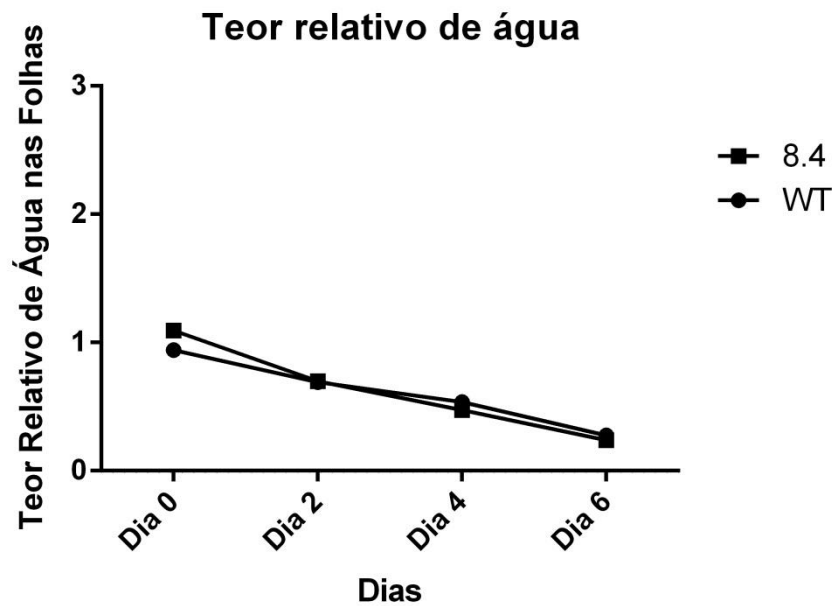


Figura 11. Teor relativo de água nas folhas durante o período de estresse hídrico da linhagem 8.4 e controle WT

Discussão

A relação do gene *RcDREB1* com estresse hídrico, assim como a capacidade de elevar a tolerância a estresse hídrico de plantas já foi observada anteriormente em tabaco (Cipriano *et al.* 2013, Rego 2015). Contudo, as análises dos dados observados na linhagem 8.4 não apontam para uma maior tolerância em soja.

Uma das hipóteses de a linhagem 8.4 não ter apresentado a tolerância ao estresse hídrico esperada é o uso do promotor 35S CaMV controlando tanto o gene de interesse *RcDREB1* quanto o gene de seleção *bar*. Cheng *et al.* (1997) observaram que 15% das transformações com *Agrobacterium* podem conter de 4 a 5 cópias do gene e um alto número de cópias de um transgene pode acarretar em silenciamento. Sabe-se que sequências repetitivas levam ao silenciamento de transgenes como ocorre em mecanismos de defesa das plantas contra vírus (Hammond *et al.* 2001). Além disso, o promotor 35S CaMV é um promotor de origem viral o que pode ter relação com silenciamento. Este mecanismo de silenciamento foi estudado por Meyer *et al.* (1992) em petúnias transgênicas com o gene *A1* de milho, o gene confere às flores a coloração salmão avermelhado, porém, quando as plantas metilam o promotor 35S CaMV, as flores apresentam um fenótipo de flores brancas. Essas metilações ocorrem de forma aleatória em uma pequena porcentagem de plantas, porém de fácil identificação. Esse mecanismo de metilação e silenciamento do promotor 35S CaMV também é conhecido em alface (*Lactuca sativa* L.), onde o silenciamento ocorre independente do número de cópias (Okumura *et al.* 2016).

Outro fator que pode influenciar a expressão do gene *RcDREB1* na linhagem 8.4 é o local de inserção do transgene, pois cada região do genoma tem uma regulação própria (Kohli *et al.* 2010). Já foi observado em arroz (*Oryza sativa*) que quando o transgene se liga a regiões de alta repetição como microsatélites ou retrotransposons, o transgene tende a ser silenciado (Takano *et al.* 1997).

Além disso, ao expressar o gene *RcDREB1* em tabaco foi observado uma variação na tolerância ao estresse entre as linhagens, provavelmente

devido ao local de inserção do gene. Portanto quanto a avaliação da eficácia do gene *RcDREB1* em soja é necessário a avaliação de mais linhagens.

Conclusão

A expressão do gene *RcDREB1* em tabaco mostrou diferenças na quantificação da prolina e na germinação. Os resultados mostram que as linhagens transgênicas possuem concentração inicial de prolina maior que nas plantas não transgênicas, porém o acúmulo durante o estresse foi menor nas plantas transgênicas. Mesmo com o menor acúmulo de prolina durante o estresse, as plantas transgênicas ainda assim foram mais tolerantes ao estresse, o que sugere que a tolerância pode não estar relacionada com o acúmulo de prolina.

Em relação ao ABA, foi observado uma ligeira insensibilidade ao ABA na repressão da germinação de sementes de tabaco, porém os resultados não são suficientes para afirmar se o gene *RcDREB1* tem seu modo ligado ao ABA durante o estresse hídrico. Ao avaliar a tolerância ao estresse salino, as plantas transgênicas de tabaco das linhagens P17 e P11 apresentam maior germinação comparadas as sementes não transgênicas, o que sugere tolerância ao estresse salino. Já nos estudos com manitol foi possível observar uma maior tolerância ao estresse osmótico somente nas plantas transgênicas da linhagem P17.

A linhagem de soja transgênica gerada não apresentou maior tolerância ao estresse hídrico testado, o que não significa que o gene *RcDREB1* não tenha efeito em soja, e sim que será necessário gerar outras linhagens transgênicas para avaliar os efeitos do gene.

Perspectivas

Será necessário gerar novas linhagens transgênicas de soja para avaliar a tolerância à seca.

Referências Bibliográficas

- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, Sopory SK (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Report* 25: 1263-1274.
- Agarwal PK, Shukla PS, Gupta K, Jha B (2013) Bioengineering for salinity tolerance in plants: State of the art. *Molecular Biotechnology* 54: 102-123.
- Aragão FJL, Brasileiro ACM (2010) Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico. In: *Cultivo in vitro de plantas* (Ed. Cid LPB) p.247-274.
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL (2000) 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. *Theor Appl Genet* 101:1-6.
- Aragão FJL, Vianna GR, Carvalheira SBRC, Rech EL (2005) Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science* 168:1227-1233.
- Bates BC Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (2008) *Climate Change and Water*. 210p.
- Bonato ER, Bonato ALV. (1987) *A soja no Brasil: história e estatística*. Documentos, 21. EMBRAPA CNPSo. Londrina.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA, Aragão FJL (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:717-726.
- Bouaziz D, Pirrello J, Ben Amor H, Hammami A, Charfeddine M, Dhieb A, Bouzayen M, Gargouri-Bouazid R (2012) Ectopic expression of dehydration responsive element binding proteins (*StDREB2*) confers higher tolerance to salt stress in potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 60:98-108.

- Brasileiro ACM, Aragão FJL (2010) O sistema Agrobacterium: do solo para o laboratório. In Cid LPB (Ed.) Cultivo in vitro de plantas, p.275-303. Brasília: Embrapa informação tecnológica.
- Brodersen C e McElrone A. (2013) Maintenance of xylem Network Transport Capacity: A Review of Embolism Repair in Vascular Plants. *Frontiers in Plant Science* 4:1-11
- Chen M Xu Z, Xia L, Li L, Cheng X, Dong J, Wang Q, Ma Y (2009) Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Experimental Botany* 60:121-135.
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ (2007) *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353: 299-305.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971-980.
- Chibi F, Angosto T, Matilla A (1995) Variations of the patterns of abscisic acid and proline during maturation of *Nicotiana tabacum* pollen grains. *J. Plant Physiol.* 147: 355–358
- Cipriano TDM, Morais AT, Aragão FJL (2013) Characterization of a pollen-specific and desiccation-associated AP2/ERF type transcription factor gene from castor bean (*Ricinus communis* L.). *International Journal of Plant Biology* 4: e1.
- CONAB (2018) Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Observatório agrícola 8.
- Cong L, Zheng H, Zhang Y, Chai T (2008) *Arabidopsis DREB1A* confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in Tobacco. *Plant Sci* 174: 156–164
- De Cleene, M., e De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical Review* 42 (4), 389-466.

- Dietz KJ, Vogel MO, Viehhauser A (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling. *Protoplasma* 245: 3-14.
- Dwivedi SK, Arora A, Singh VP, Singh GP (2017) Induction of water deficit tolerance in wheat due to exogenous application of plant growth regulators: membrane stability, water relations and photosynthesis 56: 478-486.
- Engels C, Rodrigues FA, Ferreira AO, Inagaki TM, Nepomuceno AL (2017) Drought Effects on Soybean Cultivation - A Review. *Annual Research & Review in Biology* 16: 1-13.
- FAO Statistics (2018) Commodities by country em http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country. Acessado em 10 de junho de 2018.
- Fu Y, Ma H, Chen S, Gu T, Gong J (2018) Control of proline accumulation under drought via a novel pathway comprising the histone methylase CAU1 and the transcription factor *ANAC055*. *Journal of Experimental Botany* 69: 579-588.
- Gunapati S, Naresh R, Ranjan S, Nigam D, Hans A, Verma PC, Gadre R, Pathre UV, Sane AP, Sane VA (2016) Expression of *GhNAC2* from *G. herbaceum*, improves root growth and imparts tolerance to drought in transgenic cotton and *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 6:24978.
- Gupta K, Jha B, Agarwal PK (2014) A Dehydration-Responsive Element Binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Marine Biotechnology* 16: 657-673.
- Gutha LR, Reddy AR (2008) Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant molecular biology*. 68: 533-555.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* volume 2: 110-119.
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.

- Hassan NM, El-Bastawisy ZM, El-Sayed AK, Ebeed HT, Alla MMN (2015) Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research* 6: 179-188.
- He J, Du YL, Wang T, Turner NC, Yang RP, Jin Y, Xi Y, Zhang C, Cui T, Fang XW, Li FM (2017) Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. *Agricultural Water Management* 179: 236-245.
- Hinchee MAW, et al. (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nature Biotechnology*, 6: 915-922.
- Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19: 15-38.
- Huck MG, Ishihara K, Peterson CM, Ushijima T (1983) Soybean adaptation to water stress at selected stages of growth. *Plant Physiology* 73: 422-427.
- Hymowitz T, (1970) On the Domestication of the Soybean. *Economic Botany* 24: 408-421.
- Hymowitz T, (1990) Soybeans: The Success Story. In *Advances in New Crops* 159-163.
- ISAAA (2020) GM Events with Drought stress tolerance: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gmtrait/default.asp?TraitID=18&GMTrait=Drought%20stress%20tolerance>. accessed em 10 de janeiro de 2020
- Jaleel, CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009) Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100–105.
- James C 2015 Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2015. ISAAA briefs. 51
- Jangra S, Mishra A, Kamboj D, Yadav NR, Yadav RC (2017). Engineering Abiotic Stress Tolerance Traits for Mitigating Climate Change. *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*, 59–73.
- Janiak A, Kwaśniewski M, Szarejko I (2016) Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany*. 67: 1003-1014.

- Jiang Q, Sun X, Niu F, Hu Z, Chen R, Zhang H (2017) *GmDREB1* overexpression affects the expression of microRNAs in GM wheat seeds. PLoS ONE 12: e0175924.
- Kang H, Park, SJ, Kwak KJ (2013) Plant RNA chaperones in stress response. Trends in Plant Science 18(2), 100–106.
- Kaspar TC, Taylor HM, Shibles RC (1984) Taproot elongation rates of soybean cultivars in the glasshouse and their relation to field rooting depth. Crop Science 24: 916-920.
- Khedr AHA, Serag MS, Nemat-Alla MM, Abo-Elnaga AZ, Nada RM, Quick WP, Abogadallah GM (2011) A DREB gene from the xero-halophyte *Atriplex halimus* is induced by osmotic but not ionic stress and shows distinct differences from glycophytic homologues. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106: 191-206.
- Kidokoro S, Watanabe K, Ohori T, Moriwaki T, Maruyama K, Mizoi J, Myint Phyu Sin Htwe N, Fujita Y, Sekita S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. Plant Journal 81: 505-518.
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. Trends in plant science 6: 262-267.
- Kohli A, Miro B, Twyman RM (2010) Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: Kole C, Michler CH, Abbott AG, Hall TC (eds) Transgenic Crop Plants. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lee GAH, Crawford GW, Liu L, Sasaki Y, Chen X (2011) Archaeological Soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does Size Matter? PLoS ONE 11: e26720.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis The Plant Cell 10:1391–1406
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? Plant Journal 31: 699-712.

- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LS, Nguyen HT (2009) Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260-1276.
- Martínez-Vilalta J, Garcia-Forner N (2017) Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant Cell and Environment* 40: 962-976.
- McCullen CA, Binns AN (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 101-127.
- Meckel L, Egli DB, Phillips RE, Radcliffe D, Leggett JE (1984) Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. *Agronomy Journal* 75: 1027-1031.
- Meyer P, Linn F, Heidmann I, Meyer H, Niedenhof I, Saedler H (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Molecular and General Genetics* 231: 345-352.
- Mizoi J, Shinozaki K e Yamaguchi-Shinozaki K (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta* 1819: 86-96.
- Morran S, Eini O, Pyvovarenko T, Parent B, Singh R, Ismagul A, Eliby S, Shirley N, Langridge P, Lopato S (2011) Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal* 9: 230-249.
- Nemali KS, Bonin C, Dohleman FG, Stephens M, Reeves WR, Nelson DE, Castiglioni P, Whitsel JE, Sammons B, Silady RA, Anstrom D, Sharp RE, Patharkar OR, Clay D, Coffin M, Nemeth MA, Leibman ME, Luethy M, Lawson M (2015) Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize. *Plant Cell and Environment* 38: 1866-1880.
- Nemali KS, Bonin C, Dohleman FG, Stephens M, Reeves WR, Nelson DE, Castiglioni P, Whitsel JE, Sammons B, Silady RA, Anstrom D, Sharp RE, Patharkar OR, Clay D, Coffin M, Nemeth MA, Leibman ME, Luethy M, Lawson M (2015)

Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize. *Plant, Cell & Environment* 38:1866-1880.

Newell C. (2000) Plant transformation technology. *Molecular Biotechnology* 16: 53-65.

Okumura A, Shimada A, Yamasaki S, Horino T, Iwata Y, Koizumi N, Nishihara M, Mishiba K (2016) CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Report* 35: 43-51.

Olhoft PO, Lin KL, Galbraith JG, Nielsen NN, Somers DS (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports* 20: 731-737.

Osmolovskaya N, Shumilina J, Kim A, Didio A, Grishina T, Bilova T, Keltsieva OA, Zhukov V, Tikhonovich I, Tarakhovskaya E, Frolov A, Wessjohann L (2018) Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 4089.

Oya T, Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Tobita S, Ito O. (2004) Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – Evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. *Plant Prod. Sci* 7: 129-137.

Pitzschke A, Hirt H (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* 29: 1021-1032.

Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55: 1743-1750.

Rana M, Dhamija H, Prashar B, Sharma S (2012) *Ricinus communis* L. – A Review. *Int J Pharmtech Res* 4:1706-1711.

Rech EL, Aragão FJL (1998) Biobalística. In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. Brasileiro ACM, Carneiro VTC) p. 51-64.

- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Rego TFC (2015) Expressão do gene RcDREB1 de forma constitutiva em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) UnB Brasília. Dissertação de mestrado.
- Rehman S, Mahmood T (2015) Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1-14.
- Romano E (1998). Extração de DNA de tecidos vegetais. In Manual de transformação genética de plantas (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro) 163-177. Brasília Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Sinclair TR, Serraj R (1995) Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* 378: 344.
- Sousa NL, Cabral GB, Vieira PM, Baldoni AB, Aragão FJL (2017) Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. *Scientific Reports* 7: 15385.
- Takano M, Egawa H, Ikeda JE, Wakasa K (1997) The structures of integration sites in transgenic rice. *The Plant Journal* 11: 353-361.
- Upadhyay RK, Gupta A, Soni D, Garg R, Pathre UV, Nath P, Sane AP (2017) Ectopic expression of a tomato DREB gene affects several ABA processes and influences plant growth and root architecture in an age-dependent manner. *Journal of Plant Physiology* 214: 97-107
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra RK, Kumar V, Verma R, Upadhyay RG, Pandey M e Sharma S, (2017)Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science* 8:1-12
- Wang N, Zhang W, Qin M, Li S, Qiao M, Liu Z, Xiang F (2017) Drought tolerance conferred in soybean (*Glycine max* L) by *GmMYB84*, a novel R2R3-MYB transcription factor. *Plant and Cell Physiology* 58: 1764-1776.

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Zeng P, Vadhais DA, Zhang Z, Polacco JC (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Reports* 22: 478-482.
- Zhang P, Yang P, Zhang Z, Han B, Wang W, Wang Y, Cao Y, Hu T (2014) Isolation and characterization of a buffalograss (*Buchloe dactyloides*) dehydration responsive element binding transcription factor, *BdDREB2*. *Gene* 536: 123-128.
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 37-46.

Anexo 1

Patente depositada

Aragão, FJL; CABRAL, G. B. ; REGO, T. F. C. ; SANTOS, M. P. ; Cipriano, Thaís M. .
Método de produção de planta com tolerância a estresse abiótico, planta com biomassa aumentada e/ou com pólen tolerante à dessecação, e moléculas para uso em transformação de plantas. 2016, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160217881, título: "Método de produção de planta com tolerância a estresse abiótico, planta com biomassa aumentada e/ou com pólen tolerante à dessecação, e moléculas para uso em transformação de plantas" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/09/2016

Anexo 2

Artigo em fase de revisão para submissão.

RcDREB1, a novel DREB 5-A subgroup transcription factor promote growth induction, drought tolerance and pollen viability

Aragão, FJL; CABRAL, G. B. ; REGO, T. F. C. ; SANTOS, M. P. ;
Cipriano, Thaís M

RESUMO

A seca é problema presente na culturas em todo o mundo e tem sido foco de grupos de melhoramento de plantas cultivadas. A família de fatores de transcrição DREB estão bem descritos como peças importantes em vias de sinalização `a estresses abióticos diversos e tem sido usados como genes alvo para aumento da tolerância durante períodos de estresse. O gene RcDREB1 foi caracterizado como gene expresso somente no pólen em plantas de mamona durante a antese. Nesse trabalho o gene foi superexpresso de forma constitutiva em plantas de tabaco e os resultados corroboram com as hipóteses do trabalho concedendo maior tolerância as plantas submetidas `a seca e elevando a viabilidade dos pólenes. Observamos que mesmo sob o estresse o crescimento da parte aérea nas plantas transgênicas foi mantido com redução de apenas 20% quando compradas as mesmas sob irrigação. Já as plantas WT apresentaram redução de 50% no crescimento aéreo. A manutenção da biomassa próxima as plantas irrigadas pode ser explicado pela maior fotossíntese encontrada nestas plantas e maior eficiência no uso da água que permitiram manter uma pressão de turgor por mais tempo. Ao analisar os dados das relações raiz/parte aérea de massa fresca e massa seca podemos observar que houve modificação da relação raiz parte/aérea nas plantas transgênicas indicando maior investimento das linhagens transgênicas em parte aérea. As plantas transgênicas se recuperaram mais rapidamente após o retorno da irrigação.