



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

LÍDIA NASCIMENTO QUEIROZ

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.)
Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE *HaHB11*
RELACIONADO À TOLERÂNCIA A ESTRESSES
ABIÓTICOS**

BRASÍLIA

2014

LÍDIA NASCIMENTO QUEIROZ

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.)
Merrill] PARA EXPRESSÃO DO GENE *HaHB11*
RELACIONADO À TOLERÂNCIA A ESTRESSES
ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, para obtenção do título de Mestrado

Orientador: Francisco José Lima Aragão

BRASÍLIA

2014

LÍDIA NASCIMENTO QUEIROZ

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]
PARA EXPRESSÃO DO GENE *HaHB11* RELACIONADO À
TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, para obtenção do título de Mestrado

Orientador: Francisco José Lima Aragão

Aprovada em 10/02/2014

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Francisco José Lima Aragão

Dra. Mirella Pupo Santos

Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro

Aos meus pais, Domingos e Telma, os primeiros cientistas que conheci, **dedico**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo amor dedicado e por me incentivarem a correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço à Cecília e a Isabela pela amizade inata, por me incentivar e me corrigir.

Agradeço ao Tio Teldo, Tia Dalma, Elisa e Vitor, por terem sido meus pais e irmãos aqui em Brasília.

Agradeço à minha família são-miguelense, e também à minha vó Angelina, à Tia Baby e ao Tio Teti, pelo carinho e apoio.

Agradeço especialmente à Tia Cai, que me deu apoio moral e organizou meu novo lar.

Agradeço ao tio Taquinho, à Kardec, Khalil Gibran e Orwell pelos ensinamentos de vida transmitidos nos últimos anos.

Agradeço à Mayara e a Marina por serem verdadeiras irmãs.

Agradeço à Janis, Mandis e Giou pela atenção e amizade que a gente sabe que vai estar sempre aí.

Agradeço ao Pedro e à Regina, que preencheram meus fins de semana em Brasília com carinho e alegria.

Agradeço à galera do LEG, os antigos membros e agregados: Abdul, Ana Zotta, Angélica, Carol, Cris, Cita, Felipe, as Frans, Hayana, Ju, Léo, Lilian, Mary, Mirella, Nati, Nay, Otacílio, Pabline, Pati, Rebeca, Robert, Thaís e Tomas. Obrigada pelo companheirismo e por todo tipo de ajuda.

Agradeço especialmente à Elsa, mãe de todos.

Agradeço à Gláucia pelas orientações e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao Francisco pela oportunidade e conhecimento compartilhado.

Agradeço aos membros da banca que contribuíram e irão contribuir ainda mais para o meu trabalho.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, e à EMBRAPA pela estrutura física fornecida.

“Isso de querer ser exatamente aquilo que a gente é ainda vai nos levar além”

(Paulo Leminski)

RESUMO

A ocorrência de perdas de produção na cultura de soja no Brasil é reflexo, entre outros fatores, do déficit hídrico. Ferramentas de melhoramento genético visam fornecer subsídios para contornar esses problemas na medida em que possibilitam a introdução de genes exógenos nas plantas, envolvidos na resposta a estresses ambientais. Vários genes de fatores de transcrição em plantas foram caracterizados e relacionados à tolerância ao estresse hídrico. Dentre eles, o gene do fator de transcrição *HaHB11*, de girassol, que atua como regulador positivo da cascata de sinalização dependente de ABA (ácido abscísico), aumentando a expressão dos genes de resposta que resultariam na tolerância a estresse hídrico. Na tentativa de obter plantas transgênicas de soja mais tolerantes à seca, o gene do fator *HaHB11* foi clonado no vetor pAHAS e a construção obtida foi utilizada para transformação genética de soja via biobalística, utilizando embriões zigóticos como tecido alvo. Foram gerados 14 eventos de transformação, sendo que plantas da segunda geração do primeiro evento apresentaram um locus único de integração dos transgenes. Assim, plantas T₄ deste primeiro evento, com 14 dias após a germinação, foram testadas em bioensaios para avaliação da resposta ao estresse hídrico. As plantas transgênicas apresentaram menor perda de água na parte aérea comparadas com as WT durante o estresse, além de possuírem mais raízes laterais desenvolvidas. Além disso, as plantas transgênicas também se recuperaram melhor da condição de estresse. Estes resultados indicam que as plantas transgênicas tiveram melhor desempenho durante o estresse hídrico, e que isso provavelmente está ligado a uma via de resposta dependente de ABA. No entanto, ensaios adicionais são necessários para elucidar melhor o papel do transgene em soja.

Palavras-chave: Engenharia genética, Fator de transcrição, Seca, Soja, Tolerância

ABSTRACT

The occurrence of losses of soybean (*Glycine max*) production in Brazil is related, among other factors, to water deficit. Breeding techniques aimed at addressing these problems have continuously failed due to their inability to introduce desirable genes that may be involved in response to environmental stress. Several genes of transcription factors related to drought tolerance in plants have been characterized. Among them, is the gene for sunflower transcription factor *HaHB11*, which acts as a positive regulator of the ABA-dependent (abscisic acid) signaling cascade, by increasing gene expression response, which results in tolerance to water stress. In an attempt to obtain transgenic drought-tolerant soybeans plants, the *HaHB11* gene was cloned into the pAHAS vector and the construction obtained was used for soybean genetic transformation via biolistic using zygotic embryos as target tissues. Fourteen transformation events were generated, and plants arising from the second generation of the first event had a single locus for the gene. Fourteen days after germination plants from this first event were subjected to a bioassay to assess their response to water stress. In addition to developing more lateral roots, transgenic plants showed lower water loss in shoots compared non-transgenic plants when subjected to water stress,. In addition, transgenic plants also recovered better from stress condition. These results indicate that transgenic plants performed better during water stress, and this may be linked to an ABA-dependent response pathway. However, additional trials are required to further elucidate the role of the transgene in soybean.

Keywords: Soybean, Genetic engineering, Transcription factor, Drought, Tolerance

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Soja: aspectos gerais e perdas no campo	4
2.2 Déficit hídrico	5
2.2.1 Resposta a curto-prazo.....	5
2.2.2 Resposta a longo-prazo.....	6
2.3 Fatores de transcrição regulam resposta a estresse abiótico	9
2.4 A família HD-Zip.....	10
2.4.1 A Subfamília HD-Zip I	11
2.5 O gene <i>HaHB11</i>	12
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1 Construção do vetor pAHAS- <i>HaHB11</i>	17
4.1.1 Transferência do fragmento do gene <i>HaHB11</i> : do vetor pBI121 para o pBSK.....	17
4.1.2 Transferência do fragmento do gene <i>HaHB11</i> : do vetor pBSK para o pAHAS	17
4.2 Transformação genética de soja com o vetor pAHAS- <i>HaHB11</i>	18
4.3 Diagnóstico molecular das plantas transformadas	19
4.3.1 Análise por PCR	19
4.3.2 Southern blot.....	20
4.4 Bioensaios para análise de tolerância à seca	20
4.4.1 Biometria.....	20

4.1.2 Máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm)	21
4.1.3 Estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD (CE)	21
4.1.4 Cálculo do Teor Relativo de Água	21
4.1.5 Recuperação pós-estresse	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Construção do vetor pAHAS-HaHB11	23
5.2 Transformação genética de soja e confirmação das plantas positivas	24
5.3 Bioensaios para análise de tolerância à seca	25
6 CONCLUSÃO	28
7 PERSPECTIVAS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Tabela 1 - Funções dos membros das subfamílias de genes HD-Zip

Figura 1 - Resultados diversos obtidos para caracterização do gene de girassol *HaHB11*. (A) Expressão de *HaHB11* em plantas de girassol de 7 dias de idade sujeitas a diversos tratamentos físicos e químicos, e (B) expressão de *HaHB11* em discos de plantas de girassol de 21 dias de idade submetidas a vários tratamentos hormonais. Em (C), observamos o nível da perda de água de 35S: *HaHB11* comparada com WT durante o ensaio de estresse hídrico. (D) Medida do comprimento dos hipocótilos e das raízes das plantas 35S: *HaHB11* comparada com as WT. (E) Avaliação de tolerância ao estresse hídrico severo. Resultado da recuperação das plantas após dois dias de re-irrigação.

Figura 2 - Representação esquemática do vetor pAHAS-*HaHB11* e confirmação da clonagem do gene no vetor. (A) Clivagem enzimática do vetor pAHAS-*HaHB11*. Em 1 a clivagem foi com *Not* I, em 2 com *Nco* I e em 3 com *Sac* I. (B) Representação esquemática do vetor pAHAS-*HaHB11*. O cassete está sob controle do promotor constitutivo 35SCaMV.

Figura 3 - Gel para a confirmação de plantas positivas T₀. B-P correspondem aos eventos, que foram designados por uma letra do alfabeto, de acordo com a ordem em que foram gerados. C+ e C- representam os controles positivo e negativo da PCR, respectivamente.

Figura 4 - Análise de Southern blot do DNA genômico de soja para detectar o gene *HaHB11*. A1-A9 representam plantas da segunda geração do evento "A". C- corresponde ao DNA genômico de soja controle, não-transformada

Figura 5 - Variações nos parâmetros biométricos analisados nos dois tratamentos: plantas irrigadas (cont) e plantas submetidas ao estresse hídrico (est). (A) Variação do comprimento da parte aérea entre plantas WT e transgênicas. (B) Variação do comprimento da parte radicular entre plantas WT e transgênicas. (C e E) Variação da massa fresca e seca da parte aérea entre plantas WT e transgênicas. (D e F) Variação da massa fresca e seca radicular entre as plantas WT e transgênicas.

Tabela 2 - Cálculo do Teor Relativo de Água no Solo

Figura 6 - Resultado prévio da recuperação após o bioensaio de tolerância à seca. Plantas WT e *GmHaHB11* foram submetidas a estresse hídrico severo por 10 dias e posteriormente re-irrigadas por 2 dias para avaliação da recuperação.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das espécies cultivadas há mais tempo no planeta. Registros históricos apontam que há cerca de 5.000 anos formas selvagens da planta foram semeadas em vários locais da China, Coréia e Japão (LEE et al., 2011). A primeira ocorrência do cultivo de soja no Brasil data de 1882, mas sua utilização comercial só começou a partir de 1940, na região Sul. Inicialmente, foi explorado seu potencial como forrageira, mas pouco tempo depois os grãos se tornaram o alvo do comércio e, desde então, a importância econômica da soja vem crescendo ao nível mundial (EMBRAPA, 2013).

Atualmente, o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking da produção mundial de soja, sendo que este fato se deve tanto à expansão da área plantada quanto ao aumento da produtividade. Só no último ano o índice de produção aumentou 22,7%, o que significa aproximadamente 15 milhões de ton. de soja a mais do que no ano anterior, totalizando 81 milhões de ton. produzidas na safra 2012/2013 (CONAB, 2013). Além de produtor, o Brasil também é o maior exportador de soja, representando 39% do total das exportações, destinadas principalmente para China (SOY STATS, 2013).

Com relação à estimativa da produtividade média da safra 2012/2013, as condições climáticas foram favoráveis, apesar do atraso no plantio em função do atraso das chuvas e da ocorrência de chuvas coincidindo com a colheita. Sendo assim, na última safra foi registrado um novo recorde na produtividade média nacional (CONAB, 2013). Já na safra de 2011/2012, foi observada uma grande perda na produção, que deveu-se sobretudo, à estiagem ocorrida na região Sul e no Estado do Mato Grosso do Sul. Enquanto a área plantada teve aumento de 3,4% com relação à safra 2010/2011, a produtividade caiu 14,8%. As condições climáticas adversas caracterizadas por estiagens prolongadas causadas pelo fenômeno “La Niña” foram as responsáveis pelo resultado negativo da safra (CONAB, 2012). Vale salientar que boa parte da área plantada é de ciclo precoce e por essa razão, as fases de florescimento e formação das vagens foram seriamente prejudicadas pela falta de chuva.

A disponibilidade de água é um dos principais fatores que restringe a produção, pois mesmo uma lavoura com alto potencial produtivo torna-se muito vulnerável se

houver limitações no fornecimento de água (SINCLAIR; RUFTY, 2012). Para combater os impactos da seca sobre o rendimento das culturas, há uma urgência na identificação de plantas e seus mecanismos subjacentes para melhorar a eficiência do uso da água (MCAUSLAND et al., 2013). O conhecimento desses mecanismos leva a rotas metabólicas complexas com genes específicos expressos na condição de estresse. O desenvolvimento de estratégias moleculares no combate à seca envolve a compreensão do funcionamento desses genes diferencialmente expressos, cujos produtos se encaixam em dois grupos majoritários: proteínas funcionais e proteínas regulatórias (SHINOZAKI et al., 1997).

Em um grupo de proteínas que são fatores de transcrição (FT) encontramos a família de genes HD-Zip. Algumas proteínas HD-Zip participam do desenvolvimento vascular e de órgãos ou da manutenção do meristema. Outras medeiam a ação de hormônios, ou estão envolvidas na resposta às condições ambientais (ARIEL et al., 2007). A expressão de genes da subfamília HD-Zip I é regulada por fatores abióticos como seca, temperaturas extremas, estresse osmótico, taxa de iluminação e é específico em diferentes tecidos e órgãos da planta (GAGO et al., 2002; OLSSON et al., 2004; RUEDA et al., 2005).

O gene *HaHB11* pertence a subfamília HD-Zip I e foi isolado de girassol. Ele foi eleito neste estudo por ser um membro atípico da subfamília que contém várias sequências assinatura, ou seja, sequências únicas de oligonucleotídeos. Este gene conferiu tolerância a estresses abióticos quando introduzido em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. As plantas transformadas com o gene *HaHB11* apresentaram melhor desempenho do que as plantas *wild type* (WT) frente ao estresse hídrico por promover um fechamento estomático mais rápido e o alongamento das raízes (Patente nº WO 2013/116/750 A1).

Por participarem de etapas iniciais do processo de percepção e sinalização, os FT regulam a expressão de vários grupos de genes, ou vias metabólicas (SHINOZAKI et al., 1997). Isto torna interessante o uso de FT em trabalhos de engenharia genética onde se busca aprimorar características de tolerância à seca, salinidade, congelamento, etc, que são basicamente características poligênicas.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da expressão do gene *HaHB11* de girassol em plantas de soja geneticamente transformadas submetidas ao estresse hídrico. Para atingir o objetivo geral, os objetivos específicos foram a construção de um vetor, a transformação de soja com o vetor, a confirmação da

presença do transgene no genoma da soja e o desafio das plantas transgênicas em bioensaios de estresse hídrico que simulem as condições de campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja: aspectos gerais e perdas no campo

A soja é uma espécie autógama pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, gênero *Glycine* (LEE et al., 2011). É uma planta diploide ($2n=40$), derivada de um ancestral alotetraplóide, o que explica as elevadas taxas de duplicação em seu genoma (SHOEMAKER et al., 1996).

O alto valor de mercado da soja está associado à composição nutricional dos grãos, que possuem ressaltado teor de óleo vegetal e proteínas. Além de ser fonte de macronutrientes e minerais, a soja também contém metabólitos secundários como isoflavonas, saponinas, ácido fítico, oligossacarídeos e fitoestrógenos (MANAVALAN et al., 2009).

A soja é uma planta anual de caule ereto, com grande diversidade quanto ao ciclo de vida, variando de 70 dias para as mais precoces a 200 dias para as mais tardias. As variedades brasileiras de soja são bem adaptadas a temperaturas entre 20°C e 30°C; a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento está em torno de 25°C. O crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo a temperaturas menores ou iguais a 10°C. Temperaturas acima de 40°C tem efeito adverso na taxa de crescimento, provocando distúrbios na floração e diminuição da capacidade de retenção de vagens. Esses problemas se acentuam com a ocorrência de déficits hídricos (FARIAS et al., 2007)

Um terço da população mundial reside em regiões com escassez de água, e as previsões climáticas para o futuro apontam mudanças onde períodos de seca podem tornar-se mais frequentes e graves (MANAVALAN et al., 2009). Perdas ocasionadas por estresse hídrico em soja representam cerca de 40% das perdas mundiais (SPECHT et al., 1999). No Brasil, as quedas de produção de soja têm como uma de suas principais causas a ocorrência de secas, principalmente nos estados do centro-sul do país. Para apresentar um bom desempenho, a cultura da soja necessita além de um volume de água adequado, uma boa distribuição das chuvas ao longo do ciclo, principalmente durante os períodos mais críticos. Especificamente, a soja é mais susceptível ao estresse hídrico nos estágios reprodutivos de início da vagem (R3), início da semente (R5) e de semente completa

(R6) (DOGAN et al., 2007). Além disso, durante o período de germinação tanto o excesso como a falta de água são prejudiciais ao estabelecimento da cultura. A semente de soja necessita de absorver, no mínimo, 50% do seu peso em água para uma boa germinação e o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85% do total máximo disponível (FARIAS et al., 2007).

2.2 Déficit hídrico

2.2.1 Resposta a curto-prazo

O déficit hídrico ocorre quando o conteúdo de água de um tecido ou célula está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no maior estado de hidratação; desta forma, a produtividade de uma colheita está diretamente ligada à disponibilidade de água. Uma planta que é capaz de adquirir mais água ou utilizá-la de forma mais eficiente tolera melhor as condições de estresse hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As plantas desenvolveram diferentes estratégias naturais para tolerar ou evitar condições de estresse hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2004). Quando o estresse ocorre repentinamente ou as folhas atingem o tamanho máximo antes do estresse se iniciar, o mecanismo de fechamento estomático reduz a evaporação através das folhas, sendo esta uma das respostas primárias ao estresse (SIRICHANDRA et al., 2009; FINKELSTEIN & ROCHA, 2002). Por se localizarem na epiderme, as células-guarda dos estômatos podem perder a rigidez pela evaporação de água e também perder solutos. O fitormônio ácido abscísico (ABA) desempenha um papel importante neste processo. Quando as células do mesófilo começam a desidratar ocorre, por um lado, a liberação de ABA armazenado nos cloroplastos para o apoplasto, processo chamado de redistribuição do ABA e por outro lado, ocorre a síntese de ABA, que é acumulado no apoplasto (TAIZ & ZEIGER, 2004). A concentração de solutos é determinante para abertura estomática, com destaque para o conteúdo de potássio (K^+) nas células-guarda. Os níveis elevados de ABA durante estresse hídrico induzem abertura dos canais de Ca^{2+} da membrana plasmática e inibição da bomba de prótons $H^+ATPase$, com isso ocorre bloqueio dos canais de entrada de K^+ . Além disso, o ABA também ativa o canal de saída de K^+ através da alcalinização do citosol (o pH passa de 7,6 para 7,9). Sendo assim, o

Ca^{2+} e o pH afetam os canais da membrana das células-guarda de dois modos: eles inibem o canal de entrada de K^+ , e assim previnem a abertura dos estômatos, e eles ativam os canais de saída, promovendo o fechamento estomático (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Muitas das vias metabólicas de resposta ao estresse hídrico estão envolvidas na produção de osmoprotetores, tais como açúcares (trehalose, sacarose e frutoses), aminoácidos (prolina e triptofano) e compostos de amônio (poliaminas e glicil-betaína). Estas moléculas se acumulam nas plantas sob condições de estresse como mecanismo adaptativo, que pode fornecer tolerância ao estresse. O acúmulo de solutos compatíveis também está envolvido na resposta primária ao estresse. A manipulação de genes associados com a produção de tais osmoprotetores tem sido utilizada para melhorar a tolerância ao estresse nas plantas cultivadas (REGUERA et al., 2012). Outras vias metabólicas primárias importantes são aquelas envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas em resposta a estresses abióticos. ROS são compostos tóxicos que causam danos aos componentes celulares. A engenharia genética de enzimas (peroxidase e catalase) envolvidas na detoxificação de ROS pode aumentar a tolerância a estresses abióticos (JAIN, 2013).

Muitos genes associados com estresse osmótico codificam proteínas relacionadas com transporte de membrana como ATPases e aquaporinas (proteínas de canal). Também são induzidos genes que codificam proteínas com atividade de proteases, que degradariam proteínas desnaturalizadas por estresse. A manipulação da expressão de genes que codificam para as chaperonas e proteínas abundantes da embriogênese tardia (LEA) tem sido amplamente utilizada para melhorar a tolerância ao estresse em plantas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Proteínas LEA possuem baixo peso molecular e desempenham um papel crucial na tolerância à desidratação celular, impedindo a agregação de proteínas durante a dessecação, além de ter capacidade antioxidante juntamente com um possível papel como chaperonas (REGUERA et al., 2012).

2.2.2 Resposta a longo-prazo

O estresse hídrico também provoca alterações nas vias fotossintéticas a longo prazo:

- Pigmentos fotossintéticos: clorofilas a e b

As clorofilas (a e b) e os carotenóides são os pigmentos fotossintéticos mais abundantes existentes no planeta. Por possuírem estrutura química instável, as clorofilas são facilmente degradadas, resultando em produtos de decomposição que alteram processos fisiológicos nas plantas (GONÇALVES, 2008).

O déficit hídrico é um dos estresses ambientais responsáveis pela diminuição de pigmentos nas folhas, modificando o ciclo de vida do vegetal. Assim, métodos de quantificação e de estimativa de tais pigmentos também podem ser utilizados como ferramentas para seleção de genótipos tolerantes à seca. Métodos destrutivos são citados na literatura como sendo relativamente eficientes. No entanto, o medidor portátil de clorofila SPAD-502 permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha sem destruí-la, fazendo com que tal método seja caracterizado pela simplicidade e rapidez (ARGENTA et al., 2001).

- Fluorescência da clorofila a

O fotossistema II depende de água para a geração de energia química, requerida posteriormente para a fixação de CO₂. Variações na disponibilidade hídrica geram menor eficiência do fotossistema II, menos ATP e NADPH são formados e, como consequência, menos CO₂ é fixado (LU & ZHANG, 1999; SOUZA et al., 2005).

A técnica do rendimento quântico do fotossistema II (PSII), obtido a partir da fluorescência da clorofila a, pode estimar a integridade do PSII de uma determinada folha, pois revela o nível energético de excitação dos pigmentos que dirigem a fotossíntese. Esse nível depende do balanço entre irradiação e da soma das taxas de fotossíntese e dissipação térmica (SCHOLLES & HORTON, 1993).

Uma das variáveis envolvidas na medição de fluorescência, a fluorescência inicial (F_0), indica a intensidade da fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos. O valor é obtido após a folha permanecer por um período mínimo de 30 minutos no escuro. Em seguida, após um pulso de luz, ocorre o fechamento do centro de reação pela redução do receptor de elétrons, plastoquinona A (QA), resultando no aumento da emissão da fluorescência, desde F_0 até um pico, a fluorescência máxima F_m . A diferença entre F_m e F_0 resulta na fluorescência

variável (F_v), que representa o fluxo de elétrons do centro de reação do PSII (P680) até a plastoquinona (PQH2). O rendimento quântico máximo é calculado como: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (MAXWELL & JOHNSON, 2000). A razão F_v/F_m representa o rendimento quântico máximo potencial do FSII mede o potencial de dissipação fotoquímica de energia e é um excelente indicador do efeito do estresse ambiental. Esse valor mostra-se proporcional à eficiência fotoquímica máxima do FSII bem como têm correlação com a taxa fotossintética líquida em folhas intactas. Um baixo valor indica que os centros de reação do FSII podem estar danificados. Os valores esperados para a relação F_v/F_m , na ausência de estresse, estão entre 0,75 e 0,85 (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987).

A redução da área foliar é outro efeito a longo – prazo, que ocorre devido à limitação da expansão celular, pois quando a disponibilidade de água diminui as células podem diminuir de tamanho e a parede celular fica relaxada. Menos água significa redução da pressão de turgor e conseqüente aumento da concentração de solutos no interior da célula. Este é o primeiro efeito fisiológico significativo, e as atividades que dependem da turgescência como a expansão foliar e o alongamento da raiz são mais sensíveis ao déficit de água. Em seguida, pode ocorrer a abscisão de folhas. Quando as plantas passam por períodos de estresse hídrico após desenvolver uma quantidade considerável de folhas, estas eventualmente irão senescer e cair, e isto ocorre devido à alta taxa de síntese de etileno. Alguns genes envolvidos nesta via, quando superexpressos em plantas transgênicas, levaram a uma maior tolerância ao estresse hídrico, pois provocaram redução na síntese de etileno, resultando em atraso na entrada da senescência (MANAVELLA et al., 2006; RIVERO et al., 2007).

Outro efeito é o alongamento das raízes. Isto reduz o consumo de carbono e energia, possibilitando que uma maior proporção de foto-assimilados possam ser distribuídos para o sistema radicular, favorecendo o crescimento das raízes. Plantas bem irrigadas tem um sistema radicular superficial, enquanto que, em solos pouco irrigados o sistema radicular é grande o suficiente para atingir as camadas mais profundas do solo, onde há umidade (TAIZ & ZEIGER, 2004). Assim, as plantas transgênicas que têm maior raiz primária, ou inibem o crescimento de raízes laterais podem tolerar melhor seca ou estresse salino (ARIEL et al., 2010).

O ABA é um dos fatores que influencia o crescimento da raiz e da parte aérea sob condições de baixo potencial hídrico. O nível elevado do fitohormônio endógeno

exerce um forte efeito positivo no crescimento da raiz através da supressão da produção de etileno, e um efeito ligeiramente negativo no crescimento da parte aérea. O efeito total é um aumento da relação raiz/ parte aérea em condição de baixo potencial hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O metabolismo hormonal emergiu como fator-chave na regulação da resposta ao estresse na planta. Embora o mecanismo de ação exato ainda seja desconhecido, as enzimas envolvidas no metabolismo de auxinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (ABA) têm sido estudadas em condição de estresse (JAIN, 2013)

A maquinaria de resposta hormonal rapidamente altera a expressão gênica induzindo, prevenindo ou controlando a degradação de reguladores como os fatores de transcrição. Estes compõem um grupo de proteínas que atuam indiretamente na resposta a estresses como frio, seca e salinidade (REGUERA et al., 2012).

2.3 Fatores de transcrição regulam resposta a estresse abiótico

Fatores de transcrição conhecidos como trans-elementos são capazes de se ligar a cis-elementos presentes no promotor de genes induzidos por estresse, e regular sua expressão (MIZOI, 2011). A maioria dos fatores de transcrição envolvida na resposta ao estresse em plantas pertence a famílias protéicas como AP2/ERF, HD-ZIP, NAC, MYB, MYC, NF-Y e WRKY (CHEN et al., 2012; UMEZAWA et al., 2006). Estes fatores de transcrição podem estar envolvidos em vias dependentes ou independentes de ABA.

Os estudos conduzidos com fatores de transcrição de *Arabidopsis thaliana* serviram de referência para classificação e descrição destes fatores em outras espécies. A superexpressão do cDNA que codifica DREB1A (proteína de ligação do elemento de resposta a desidratação, membro da família AP2/ERF), sob controle do promotor rd29A induzível por estresse, ativou em plantas transgênicas a expressão de muitos genes de tolerância ao estresse sob condições normais de crescimento e resultou em uma melhor tolerância à seca, salinidade e ao frio (KASUGA et al., 1999).

Plantas transgênicas superexpressando três genes *nac* de *Arabidopsis* (*ANAC019*, *ANAC 055* e *ANAC072*) exibiram tolerância à seca, derivada da detoxificação de aldeídos tóxicos (ROS) pela via da glioxalase (TRAN et al., 2004).

Fatores de transcrição WRKY de *Boea hygrometrica*, uma planta que é capaz de sobreviver à dessecação, se ligam a cis-elementos presentes no promotor e ativam o gene da galactinol sintase, enzima importante para tolerância a seca e frio (RUSHTON et al., 2010).

2.4 A família HD-Zip

A família HD-Zip de fatores de transcrição é exclusiva do reino vegetal. Essas proteínas exibem a combinação singular de um homeodomínio no carboxi-terminal, que possui o sítio de ligação ao DNA, com um zíper de leucina funcionando como motivo de dimerização. Esta família pode ser classificada em quatro subfamílias, segundo um conjunto de características distintivas que incluem as especificidades de ligação ao DNA, as estruturas dos genes, os motivos comuns adicionais e funções fisiológicas (Tabela 1) (ARIEL et al., 2007).

A subfamília HD-Zip II demonstrou resposta diferenciada a auxinas e condições de iluminação (RUEDA et al., 2005; MORELLI & RUBERTI, 2002). Já a subfamília HD-Zip III atua na regulação meristemática, iniciação de órgãos laterais, polaridade de folhas, desenvolvimento do sistema vascular, transporte de auxina, iniciação de órgãos laterais e embriogênese (BAIMA et al., 2001; MORELLI & RUBERTI, 2000; PRIGGE et al., 2005). Associada à diferenciação das células epidérmicas, ao acúmulo de antocianinas, ao desenvolvimento radicular e à formação de tricomas encontramos a subfamília HD-Zip IV (NAKAMURA et al., 2006).

Tabela 1. Funções dos membros das subfamílias de genes HD-Zip

Subfamília	Funções
HD-Zip I	Resposta a estresse abiótico; Resposta ao ABA
HD-Zip II	Resposta a condições de iluminação; Resposta à auxina.
HD-Zip III	Embriogênese; Regulação meristemática; Desenvolvimento do sistema vascular; Transporte de auxina.
HD-Zip IV	Diferenciação celular; Formação de tricomas; Desenvolvimento de raiz.

Fonte: ARIEL et al., 2007

A subfamília HD-Zip I tem funções relacionadas com a resposta ao estresse abiótico, resposta ao ABA, de-etiolação e mediação de resposta à luz azul (GAGO et al., 2002; HENRIKSSON et al., 2005; HIMMELBACH et al., 2002; OLSSON et al., 2004; WANG et al., 2003). É provável que haja uma vantagem seletiva para a planta na retenção de um número crescente de genes de HD-Zip I, porque isto gera um aumento da capacidade de ajuste da resposta de crescimento durante mudanças nas condições ambientais (HENRIKSSON et al., 2005).

2.4.1 A Subfamília HD-Zip I

Em arroz, a expressão de *OsHOX22* que é membro da subfamília HD-Zip I, é fortemente induzida pelo estresse salino, ABA e tratamento de polietileno glicol (PEG), e foi concluído que este fator de transcrição afeta a biossíntese de ABA e regula respostas a seca e salinidade através de vias de transdução de sinais mediadas por ABA (ZHANG et al., 2012).

Experimentos realizados com mutantes de *Medicago truncatula*, deficientes na expressão de *MtHB1*, evidenciaram o papel deste fator na regulação do desenvolvimento radicular. Foi observado que ele induz uma resposta adaptativa para minimizar a superfície radicular exposta a estresses ambientais adversos (ARIEL et al., 2010).

Os fatores *AtHB12* e *AtHB7* em *Arabidopsis* podem agir por meio de mecanismos semelhantes mediando uma resposta de crescimento frente ao déficit hídrico. Os genes possuem 80% de similaridade de sequência, sendo parálogos entre si. *AtHB7*, que é ativado especificamente sob condições de déficit hídrico, age regulando negativamente o crescimento (SÖDERMAN et al., 1996; HJELLSTROM et al., 2003). Da mesma forma, *AtHB12* regula negativamente a expressão de GA 20-oxidase nas hastes com inflorescência, que conduz a um fenótipo de haste curta devido a uma redução no teor de giberelina (SON et al., 2010). Tanto *AtHB7* quanto *AtHB12* são responsivos ao ABA, à seca e a atividade das Serina/Treonina fosfatases ABI1 e ABI2 (OLSSON et al., 2004).

O fator de transcrição HD-Zip I de girassol *HaHB4*, já bem caracterizado, compartilha 60% de identidade de sequência com *AtHB7* e 53% de identidade com *AtHB12* no domínio HD-Zip (GAGO et al., 2002). No entanto, *HaHB4* tem uma região carboxi-terminal curta (CTR, 64 aminoácidos após a região do zíper de leucina), enquanto *AtHB7* e *AtHB12* apresentam 127 e 106 aminoácidos na região,

respectivamente. A expressão de *HaHB4* é muito baixa em condições normais de crescimento, mas pode ser induzida por substâncias ou condições específicas. ABA, manitol, NaCl, seca e escuridão induzem expressão deste FT (fator de transcrição) em raízes, caules e folhas, bem como ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (DEZAR et al., 2005; GAGO et al., 2002; MANAVELLA et al., 2006/2008a/2008b). O fenótipo observado quando este gene de girassol é ectopicamente expresso em plantas de *Arabidopsis* se assemelha muito ao de plantas que super-expressam *AtHB7/12* (DEZAR et al., 2005). Entretanto, as plantas transformadas com *HaHB4* exibiram tolerância a seca e um atraso na entrada da senescência, enquanto *AtHB7* e *12* não. Quando as plântulas expressando *HaHB4* foram tratadas com ACC exógeno (ácido 1 - aminociclopropanocarboxílico, um precursor da biossíntese de ET) não apresentaram a resposta típica ao etileno (MANAVELLA et al., 2006). Essa observação, juntamente com uma análise de *microarray*, indicou que *HaHB4* inibe a expressão de receptores de etileno e, posteriormente, a capacidade de resposta a esse hormônio (MANAVELLA et al., 2006/2008b).

2.5 O gene *HaHB11*

O gene *HaHB11* pertence à subfamília HD-Zip I de girassol e codifica uma proteína de 175 aminoácidos. *HaHB11* é um membro atípico da subfamília, assim com *HaHB4*, e não apresenta homólogos nas plantas de genoma sequenciado. Árvores filogenéticas construídas com os membros desta subfamília colocaram *HaHB11* no mesmo subgrupo de *AtHB7*, *AtHB12*, *HaHB4* e *MtHB1* (CHAN et al., 1998; ARIEL et al., 2010). Em estudos posteriores, devido à disponibilidade das sequências de bancos de dados de outras espécies de plantas, Arce e colaboradores (2011) reconstruíram uma árvore em que *HaHB11* e *HaHB4* não se localizavam no mesmo grupo que os seus supostos homólogos de *Arabidopsis* ou de qualquer outra espécie, sendo membros da subfamília divergentes.

O estudo do padrão de expressão de *HaHB11* foi conduzido com duas metodologias principais. Num primeiro momento foi determinado o padrão de expressão deste gene em plantas de girassol, enquanto a segunda abordagem envolveu a avaliação de plantas de *Arabidopsis thaliana* geneticamente transformadas com *HaHB11*. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram

consistentes e indicaram que *HaHB11* é expresso na base de hipocótilos e cotilédones de plântulas de girassol de sete dias de idade, e a expressão é geralmente detectada em raiz, hipocótilo e pecíolo em plantas de 21 dias (Patente nº WO 2013/116/750 A1). *HaHB11* é regulado positivamente pelo estresse hídrico, NaCl e ABA (Figuras 1A e 1B). Este padrão de expressão foi semelhante ao de *AtHB7* e *12* na presença de NaCl (SHIN et al., 2004; HENRIKSSON et al., 2005) e estresse hídrico (OLSSON et al., 2004). É também similar ao padrão de expressão que ocorre em folhas e raízes observado para *AtHB7*, enquanto *AtHB12* apresentou uma expressão muito fraca nas raízes (HENRIKSSON et al., 2005). *MtHB1*, por sua vez, apresentou expressão no meristema apical da raiz e nos primórdios das raízes laterais (ARIEL et al., 2010), diferente de *HaHB11* que parece se expressar em toda raiz, exceto o meristema apical. *HaHB4* também é expresso nos primórdios das raízes laterais, além de ter a expressão induzida por estresse hídrico e ABA (DEZAR et al., 2005).

Após análise da expressão, foram conduzidos estudos para investigar as plantas transgênicas frente ao estresse hídrico. Foi aplicado um estresse hídrico severo a um conjunto de plantas transgênicas e selvagens. Plantas de 21 dias de idade tiveram a rega suspensa por 14 dias. Quando as plantas mostraram deterioração grave, falta de firmeza e aparecimento de necrose, foram regadas novamente e os sobreviventes foram contados após dois dias de recuperação. A quantificação indicou que 67% das plantas da linhagem com menor expressão transgênica e 95% das plantas da linhagens transgênicas com maior expressão sobreviveram ao tratamento, enquanto apenas 12% das plantas WT puderam ser contadas (Figura 1E) (Patente nº WO 2013/116/750 A1).

Para saber por qual mecanismo fisiológico as plantas foram tolerantes a seca foram realizados ensaios adicionais. Como mostrado na Figura 1C, as plantas 35S: *HaHB11* perderam menos água para o tratamento do estresse, o que indicou que a tolerância à seca observada foi devido à capacidade de retenção de água disponível. Este mesmo teste mostrou outras informações relevantes, pois para perder menos água, a biomassa de plantas transgênicas continuou aumentando, enquanto a de plantas WT diminuiu consideravelmente durante o teste (Patente nº WO 2013/116/750 A1). O mecanismo mais conhecido pelo qual as plantas são capazes de perder menor quantidade de água é o fechamento dos estômatos mediado por ABA.

Tendo em vista a provável atuação do ABA durante o estresse nas plantas transgênicas, foi investigado se o fitohormônio promovia um aumento da relação Raiz/ Parte aérea. Ao medir o comprimento dos hipocótilos e das raízes verificou-se que as plantas transgênicas têm hipocótilos mais curtos e raízes mais longas do que seus pares não transformados e esta diferença foi proporcional aos níveis de expressão do transgene (Figura 1D) (Patente nº WO 2013/116/750 A1).

Comparando *HaHB11* e *HaHB4*, ambos conferiram tolerância a seca, mas de maneiras diferentes, já que as plantas transformadas com *HaHB4* apresentaram raízes mais curtas que as plantas WT, ao contrário das plantas 35S: *HaHB11* que possuem raízes mais longas. Além disso, a tolerância conferida por *HaHB4* foi devida principalmente a um atraso na entrada da senescência causado pela inibição da biossíntese e percepção do hormônio etileno (DEZAR et al., 2005; MANAVELLA et al., 2006), enquanto *HaHB11* produziu fechamento estomático mais rápido frente a condição de estresse hídrico, que pareceu ser relacionado com ABA (Patente nº WO 2013/116/750 A1).

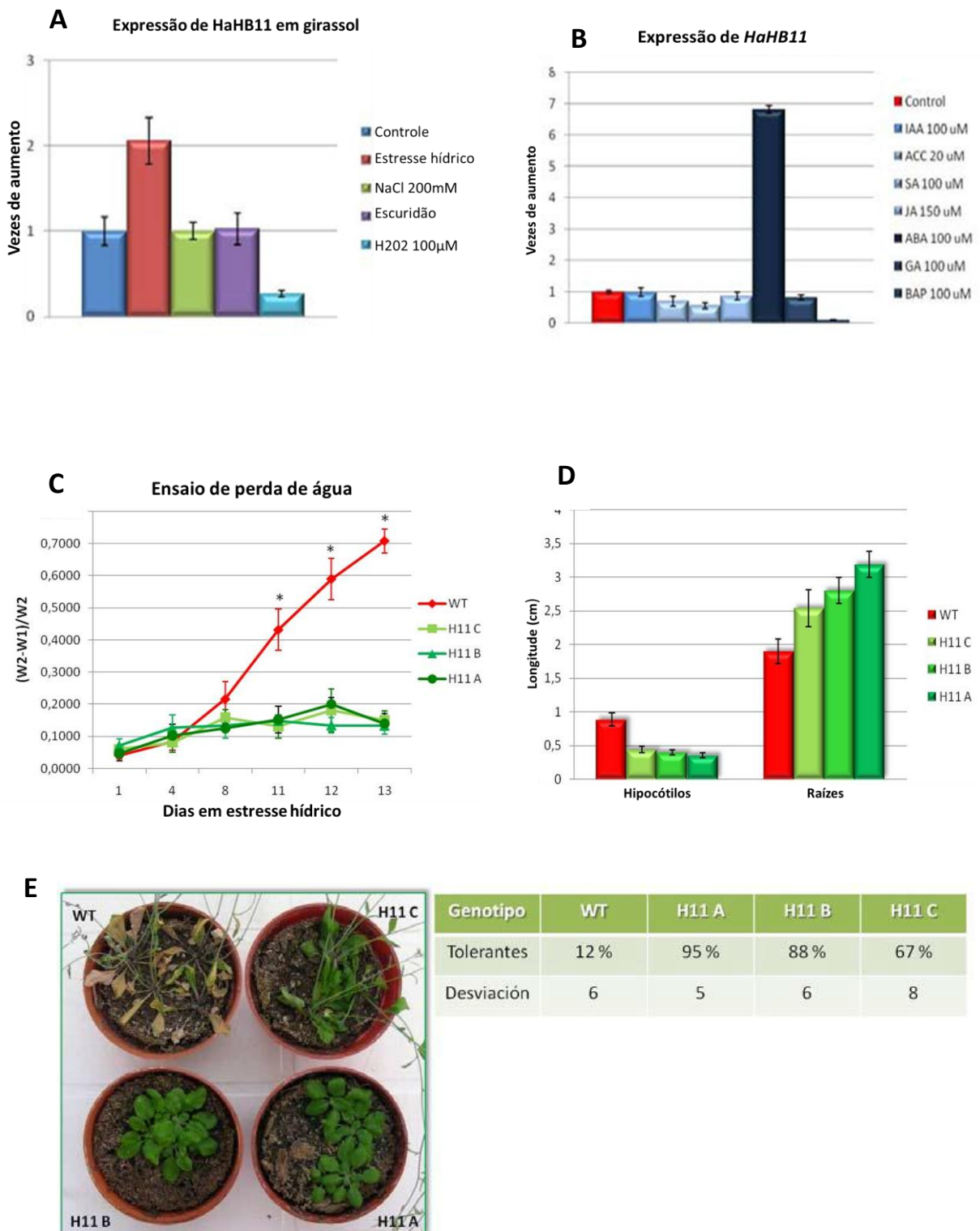


Figura 1: Resultados diversos obtidos para caracterização do gene de girassol *HaHB11*. (A) Expressão de *HaHB11* em plantas de girassol de 7 dias de idade sujeitas a diversos tratamentos físicos e químicos, e (B) expressão de *HaHB11* em discos de plantas de girassol de 21 dias de idade submetidas a vários tratamentos hormonais. Em (C), observamos o nível da perda de água de 35S: *HaHB11* comparada com WT durante o ensaio de estresse hídrico. (D) Medida do comprimento dos hipocótilos e das raízes das plantas 35S: *HaHB11* comparada com as WT. (E) Avaliação de tolerância ao estresse hídrico severo. Resultado da recuperação das plantas após dois dias de re-irrigação (Dados não publicados. Adaptado da patente n° WO 2013/116/750(A1)).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Expressar o gene *HaHB11* em plantas geneticamente modificadas de soja e estudar a resposta das plantas à condição de estresse hídrico.

3.2 Objetivos específicos

- Construção de um vetor contendo o gene *HaHB11* de girassol, sob controle do promotor constitutivo 35SCAMV, e do gene *Atahas* que confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolinonas.
- Transformação genética de soja via biobalística com o vetor pAHAS- *HaHB11*
- Avaliação das plantas transgênicas frente a condição de estresse hídrico

4. METODOLOGIA

4.1 Construção do vetor pAHAS-HaHB11

4.1.1 Transferência do fragmento do gene HaHB11: do vetor pBI121 para o pBSK

Inicialmente o fragmento do gene *HaHB11* de girassol contido no vetor pBI121 foi amplificado por PCR a partir do DNA plasmidial, utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e os seguintes *primers* específicos:

- 5'-GTAGTTGAGACCATGGCAGAAAACAGTAGTAG- 3' e
- 5'-GCATACGCGAGCTCATGAGTTTGATGACCAAATG- 3'

Durante a amplificação foram adicionados sítios de restrição para *Nco* I e *Sac* I (sublinhadas), respectivamente, e o fragmento amplificado foi purificado através do *kit Wizard[®] SV Gel PCR Clean-Up System* (PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. O fragmento do gene purificado foi então clivado com as enzimas de restrição *Sac* I e *Not* I e ligado ao vetor pBSK, que havia sido previamente digerido com as mesmas enzimas. Este vetor comercial possui o gene de resistência à ampicilina e é constituído pelo promotor constitutivo CaMV35S do vírus do mosaico da couve-flor e da região terminadora do gene *nos*, sendo que o fragmento de *HaHB11* foi inserido na região intergênica, para construção do cassete de expressão em plantas. O plasmídeo resultante foi inserido em células competentes de *E. coli* XL1-*Blue* por eletroporação de acordo com o protocolo descrito por Brasileiro e colaboradores (1998). O diagnóstico molecular dos transformantes foi feito por PCR e restrição enzimática, e o vetor foi denominado pBSK-HaHB11.

4.1.2 Transferência do fragmento do gene HaHB11: do vetor pBSK para o pAHAS

O cassete foi retirado do vetor pBSK utilizando a enzima *Not* I e purificado do gel como descrito anteriormente. Após esta etapa a construção foi submetida à reação de ligação com vetor pAHAS, previamente clivado com *Not* I e defosforilado. O vetor pAHAS possui região codificante para a enzima ácido acetohidroxi sintase (AHAS, EC 2.2.1.6) de *Arabidopsis thaliana*, também conhecida como acetolactato sintase (ALS) e exclusiva do reino vegetal. ALS catalisa a produção de

valina, leucina e isoleucina, aminoácidos alifáticos de cadeia ramificada necessários para a síntese de proteínas e o crescimento de células em plantas (TU et al, 2004). A enzima AHAS mutada confere tolerância aos herbicidas da classe das imidazolininas.

Células de *E. coli* XL1-*Blue* foram transformadas com o plasmídeo por eletroporação e transferidas para placas contendo LB e ampicilina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi realizado um PCR de colônias para confirmação da clonagem. As colônias que apresentaram amplificação dos fragmentos esperados foram selecionadas, transferidas para tubos com meio LB e ampicilina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e incubadas a 37°C e 180 rpm por 14h. Estes clones foram estocados, posteriormente, a -80°C , em glicerol 25%. O DNA plasmidial foi extraído com o *kit Wizard® Plus SV Miniprep* (PROMEGA) segundo as recomendações do fabricante. A clonagem foi confirmada através de reações de PCR realizadas como descrito anteriormente, clivagem por enzimas de restrição e sequenciamento. A construção foi denominada pAHAS-HaHB11. Foi feita uma *maxiprep* segundo o protocolo descrito por Brasileiro (1998), para obtenção de DNA plasmidial na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, necessário na transformação genética por biobalística.

4.2 Transformação genética de soja com o vetor pAHAS-HaHB11

Foram utilizados como explantes eixos embrionários de soja (*Glycine max* L. Merril) cv. Conquista. As sementes foram esterilizadas em etanol 70% por 1 min e tratadas com hipoclorito de sódio 1,0% por 20 minutos. Posteriormente foram lavadas cinco vezes em água destilada estéril, permanecendo por 16 a 18 horas embebidas em água destilada para ficarem entumescidas. O eixo embrionário foi separado dos cotilédones e foram retirados os primórdios foliares, expondo o meristema apical. Os embriões foram então posicionados em placas de Petri de 5cm contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e *Phytigel* 0,8%. Em cada placa haviam 10 explantes dispostos com os meristemas voltados para cima, dentro do raio de distribuição da partícula e fora da região central onde a zona de choque é intensa. O bombardeamento seguiu protocolo descrito Rech et al. (2008).

Após o bombardeamento os embriões foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de indução composto por MS, sacarose 3%, ágar 0,6% e BAP (Benzilaminopurina) 5mg/L, com o pH final ajustado para 5,8.

Depois de um período de 24hs no meio de indução os embriões foram transferidos novamente, dessa vez para um meio de cultivo contendo MS, sacarose 3%, ágar 0,8%, com pH final ajustado para 5,8. Depois de autoclavado e resfriado foi adicionado o herbicida *imazapyr* no meio para uma concentração final de 500 η M.

O *imazapyr* é um herbicida que é absorvido rapidamente através dos tecidos da planta e também pelas raízes. Ele é translocado através do xilema e floema para os tecidos meristemáticos e é capaz de inibir a atividade da enzima AHAS (TU et al., 2004). As plantas transformadas com o vetor pAHAS-HaHB11 se tornam resistentes à ação do herbicida (item 4.1.2) por expressarem a enzima AtAHAS mutada, que não é inibida pelo *imazapyr*.

Os embriões, depois da transformação, ficaram cerca de dois meses no meio de cultivo, e após esse período os que haviam se desenvolvido foram transferidos para um meio MS ½ força. Este meio possui os mesmos componentes do meio de cultivo, exceto *imazapyr*, além de ter metade da concentração de MS, o que induziu o enraizamento dos explantes. No caso em que os embriões possuíram mais de uma ramificação derivada do alongamento do meristema apical, que pudesse originar plantas quiméricas, as ramificações secundárias foram removidas. Cerca de 15 dias depois da transferência o processo de regeneração se completou e as plântulas transgênicas regeneradas foram aclimatadas em casa de vegetação até completar seus estágios de desenvolvimento (ARAGÃO et al., 2000; RECH et al., 2008).

A progênie oriunda das plantas T₀, correspondente à primeira geração de plantas transgênicas, foi plantada para que pudessem ser obtidas informações sobre o padrão de segregação em T₁. O avanço das progênies permite uma garantia maior de que os grupos de plantas submetidas ao bioensaios não apresentem um número significativo de indivíduos não-transgênicos.

4.3 Diagnóstico molecular das plantas transformadas

4.3.1 Análise por PCR

O DNA foi isolado a partir de folhas jovens das plantas regeneradas, de acordo com protocolo já descrito (BRASILEIRO, 1998). A análise inicial foi realizada

por PCR, e foram utilizados *primers* específicos para a sequência alvo do gene *HaHB11* (item 4.1.1).

4.3.2 Southern blot

A análise por *Southern blot* seguiu os parâmetros descritos por Sambrook & Russell (2001). O DNA genômico das plantas transformadas foi digerido com *Xba I*, separado em gel de agarose 0,8%, e transferido para uma membrana de nylon (*Hybond™-N+*; *Amersham Pharmacia Biotech*). A partir disso a hibridização foi realizada com uma sonda de DNA, correspondente ao fragmento do gene *HaHB11* de 565 pb amplificado, marcado com a utilização do kit *Ready-To-Go™ DNA Labeling Beads-dCTP* (*Amersham Pharmacia Biotech*) de acordo com instruções do fabricante.

4.4 Bioensaios para análise de tolerância à seca

Para realização deste bioensaio foram selecionadas 100 plantas de soja T₄ de uma das 15 linhagens transgênicas obtidas e 100 plantas de soja controle (WT), não transformadas, que foram plantadas em copos plásticos de 300mL com furo único na base, contendo solo numa mistura de vermiculita e de latossolo na proporção 1:1. Cem plantas de soja de 14 dias (após a germinação), sendo 50 destas WT e 50 transgênicas, foram submetidas a um tratamento de déficit hídrico onde a rega foi retida por 10 dias. Em outro tratamento, 50 plantas WT e 50 plantas transgênicas permaneceram irrigadas em intervalos de 48 horas, até a capacidade de campo. Após este período foram avaliados parâmetros biométricos e fisiológicos comparando os dois tratamentos, denominados (1) “Estresse” e (2) “Irrigação”. Também foi avaliada a recuperação de plantas que sofreram desidratação e foram novamente irrigadas.

4.1.1 Biometria

Dentro de cada tratamento, 30 plantas WT e 30 plantas transgênicas foram selecionadas aleatoriamente para as avaliações biométricas. Foram aferidas massa fresca e massa seca da raiz e da parte aérea, separadamente, bem como o

comprimento radicular e o comprimento da parte aérea. Foi feito um teste *Tukey* com 95% de significância para validar os valores obtidos. Os parâmetros fisiológicos envolveram medidas de clorofila *a* com SPAD e medidas de fluorescência da clorofila *a* com o fluorímetro.

4.1.2 Máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m)

Determinada nas folhas +1 com um fluorômetro portátil (*Opti-Sciences, Inc.*, Hudson, NH, EUA). As folhas foram pré-escurecidas por 30 minutos, com auxílio de cliques específicos, antes das medidas de fluorescência. A variável F_v/F_m foi determinada seguindo os procedimentos de Maxwell & Johnson (2000), onde F_m é a máxima intensidade da fluorescência em que todos as reações do fotossistema II (FSII) se fecham; F_0 é a mínima intensidade de fluorescência, quando os centros de reações do FSII estão abertos, e F_v é a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$). As leituras foram realizadas entre às 9 e 11 horas da manhã.

4.1.3 Estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD (CE)

O CE foi determinado usando um clorofilômetro SPAD-502 (*Minolta Corp.*, Ramsey, NJ, EUA). A média foi considerada a de três leituras nas folhas +1. A leitura (unidade SPAD) corresponde ao teor de pigmento na folha, e seu valor é equivalente à quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda, nas quais a absorção de clorofila é diferente (MALAVOLTA et al., 1997). Dessa maneira, o valor fornecido é proporcional à quantidade de clorofila existente na folha.

4.1.4 Cálculo do Teor Relativo de Água

Foi determinado o teor relativo de água no solo tanto das plantas submetidas ao estresse quanto das plantas irrigadas, através do seguinte cálculo:

$$\text{TRA} = [(\text{Massa total (amostra)} - \text{Massa seca}) / \text{Massa total}] \times 100\%$$

A massa total foi padronizada em 10g para todas as amostras. A massa seca corresponde à massa total de solo de cada planta após secagem em estufa, na temperatura de 50°C, por sete dias. Será considerada a média de três repetições

para o cálculo dos dois tratamentos (plantas secas/irrigadas), tanto para as WT quanto para as geneticamente modificadas (GM). O resultado desta fórmula fornece uma estimativa do conteúdo de água disponível no solo, e com isso é possível fazer inferências sobre o desempenho das plantas WT comparadas com as transgênicas durante o estresse.

4.1.5 Recuperação pós-estresse

As mesmas plantas que foram utilizadas nas avaliações fisiológicas do tratamento de estresse hídrico foram re-irrigadas. Após dois dias foi feita uma avaliação visual da recuperação destas plantas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do vetor pAHAS-HaHB11

O fragmento correspondente ao gene *HaHB11* foi amplificado a partir do clone pBI121-HaHB11 utilizando-se *primers* específicos (item 4.4.1), purificado e ligado ao vetor pBSK. Depois de inserido em células de *E. coli* XL1-Blue, foi realizado PCR de colônias dos possíveis transformantes designados pBSK-HaHB11. Foram feitas mais duas reações como controle, utilizando as mesmas condições, com o plasmídeo pBI121-HaHB11 de *template* para o controle positivo e água para o controle negativo. A partir de algumas colônias selecionadas, foi realizada a extração do DNA plasmidial para ser submetido à restrição enzimática. Após a confirmação da clonagem, foi realizada a subclonagem do cassete de expressão no vetor pAHAS. A confirmação dos clones recombinantes foi feita por PCR, clivagem enzimática (Figura 2A) e sequenciamento. A figura 2B demonstra a construção no vetor para transformação genética de plantas pAHAS-HaHB11.

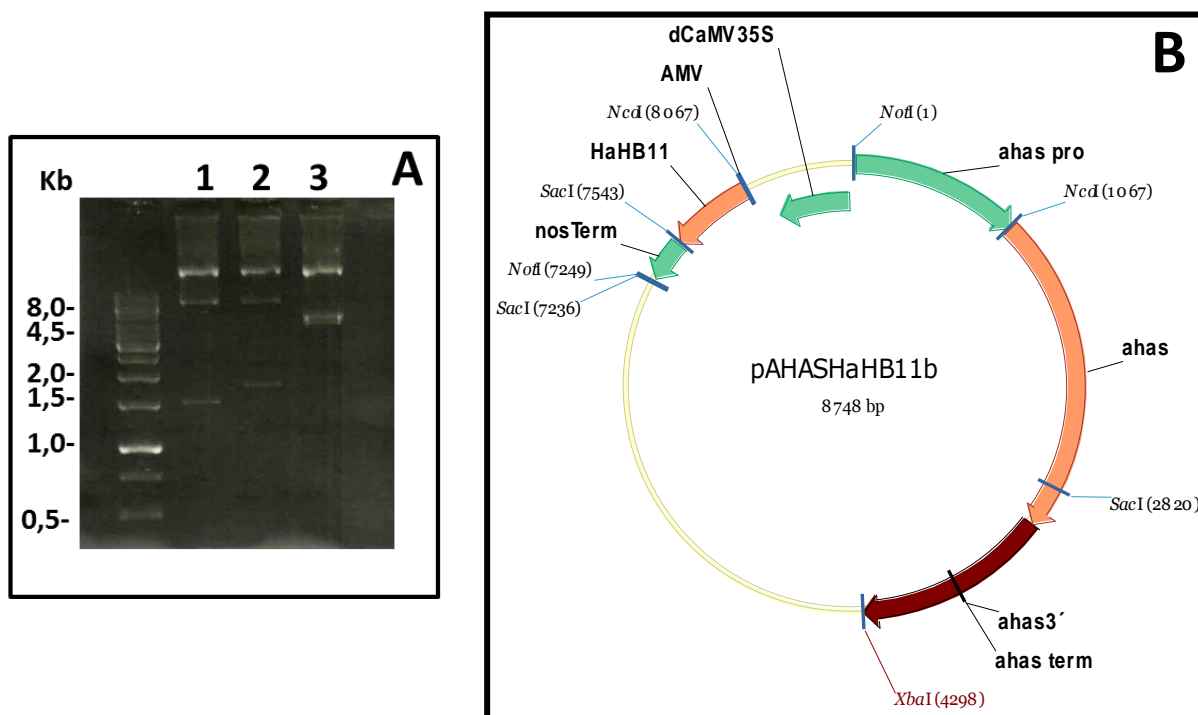


Figura 2: Representação esquemática do vetor pAHAS-*HaHB11* e confirmação da clonagem do gene no vetor. (A) Clivagem enzimática do vetor pAHAS-*HaHB11*. Em 1 a clivagem foi com *Not* I, em 2 com *Nco* I e em 3 com *Sac* I. **(B)** Representação esquemática do vetor pAHAS-*HaHB11*. O cassete está sob controle do promotor constitutivo 35SCaMV.

5.2 Transformação genética de soja e confirmação das plantas positivas

Os embriões de soja que se regeneraram durante a fase de cultura de tecidos em meio de cultivo contendo o herbicida *imazapyr* foram transferidos para um meio de enraizamento e posteriormente aclimatados em casa de vegetação. Foram realizadas inicialmente reações de amplificação para confirmação das plantas positivas. Um total de 13 eventos foram confirmados por PCR (Figura 3), utilizando-se *primers* específicos para a região do gene *ahas*, e a medida em que haviam sido gerados foi designada uma letra do alfabeto para identificação (Exemplo: o primeiro evento foi denominado “A”, o segundo “B”, e assim sucessivamente). A progênie do primeiro evento obtido, a planta T₀ “A”, foi uma única semente de soja. Esta semente gerou a planta T₁ “A”, sendo que 9 plantas da progênie de T₁ “A” foram confirmadas pela técnica de *Southern blot*, onde foi utilizado como sonda específica o fragmento do gene *HaHB11* amplificado por PCR e purificado (Figura 4). A análise de *Southern* demonstrou que o gene deve ter se inserido em um único *locus* no genoma das plantas do evento A. O fato de 9 plantas mostrarem o mesmo padrão corrobora para a hipótese de que há um único *locus* estável.

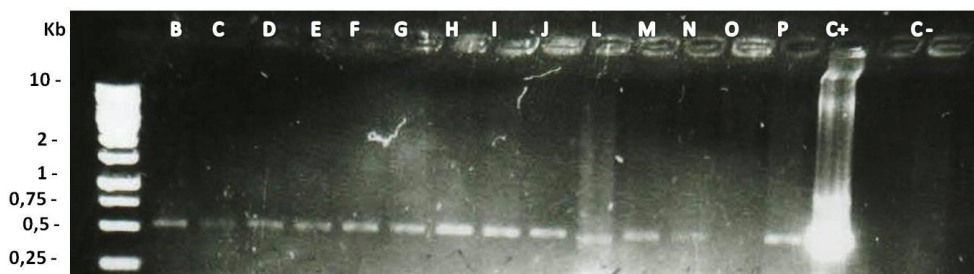


Figura 3: Gel para a confirmação de plantas positivas T₀ utilizando primers específicos para amplificação do gene *HaHB11*. B-P correspondem aos eventos, que foram designados por uma letra do alfabeto, de acordo com a ordem em que foram gerados. C+ e C- representam os controles positivo e negativo da PCR, respectivamente.

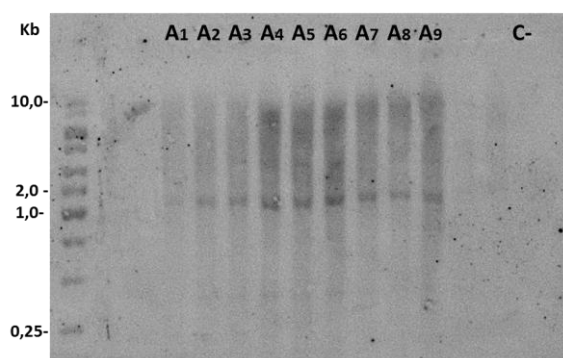


Figura 4: Análise de Southern blot do DNA genômico de soja para detectar o gene *HaHB11*. A1-A9 representam plantas da segunda geração do evento “A”. C- corresponde ao DNA genômico de soja controle, não-transformada.

5.3 Bioensaios para análise de tolerância à seca

Não foram obtidos resultados significativos para a fluorescência da clorofila *a* e as medidas de clorofila com SPAD, já que as plantas estressadas e não-estressadas exibiram valores de leitura muito similares. Isto pode ter ocorrido porque as condições de estresse não foram severas o bastante para alterar significativamente esses parâmetros fisiológicos.

Nos resultados da biometria é possível distinguir claramente que a massa fresca da parte aérea das plantas transgênicas foi maior que a das plantas WT após o período do estresse hídrico (Figura 5C). Estes resultados foram similares ao obtido em plantas de *Arabidopsis* transformadas com o mesmo gene, onde foi observado um aumento da biomassa das plantas transgênicas durante o estresse em comparação com as WT, que perderam biomassa na parte aérea (Figura 1C) (Patente nº WO 2013/116/750 A1). A estratégia mais utilizada pelas plantas para perder menos água durante a condição de estresse é o fechamento estomático mediado por ABA. Outro indicativo de que as plantas transgênicas aumentaram sua biomassa na parte aérea, ou perderam menos biomassa, devido à maior retenção de água durante o estresse, é o fato de que a massa seca não foi estatisticamente diferente comparada com a da WT (Figura 5E). As plantas transgênicas apresentaram comprimento da parte aérea ligeiramente maior em comparação com as WT, embora os resultados esperados fossem o contrário dos obtidos. Olsson et al. (2004) associaram os genes *AtHB7* e *-12* à regulação negativa do alongamento da parte aérea, pois durante o estresse as plantas transgênicas apresentaram menor parte aérea comparada com as WT. Os resultados contraditórios deste experimento podem ter ocorrido porque as condições do estresse hídrico foram mais brandas em comparação com o bioensaio com *Arabidopsis*, portanto experimentos adicionais são necessários para fazer mais inferências sobre este parâmetro. O comprimento radicular, que foi medido com base no comprimento da raiz primária, foi ligeiramente maior nas plantas WT estressadas apesar da massa, tanto fresca quanto seca, ter sido maior nas plantas transgênicas estressadas. Estes resultados podem indicar que o maior valor da massa exibido nas plantas transgênicas estressadas refletiu um aumento do número de raízes laterais. Outra possibilidade é a de que as plantas transgênicas tenham perdido menos massa radicular comparadas com as WT. Em *Arabidopsis*, o gene *HaHB11* induziu maior

comprimento radicular (Figura 1D), e em *Medicago truncatula* o fator de transcrição *MtHB1* superexpresso reprimiu a emergência de raízes laterais em condições de estresse abiótico (ARIEL et al., 2010). Isto pode ser um indicativo que o gene *HaHB11* induz uma resposta de tolerância na raiz de forma diferente, aumentando a superfície de contato no solo para absorver mais água e sobreviver melhor à condição de estresse.

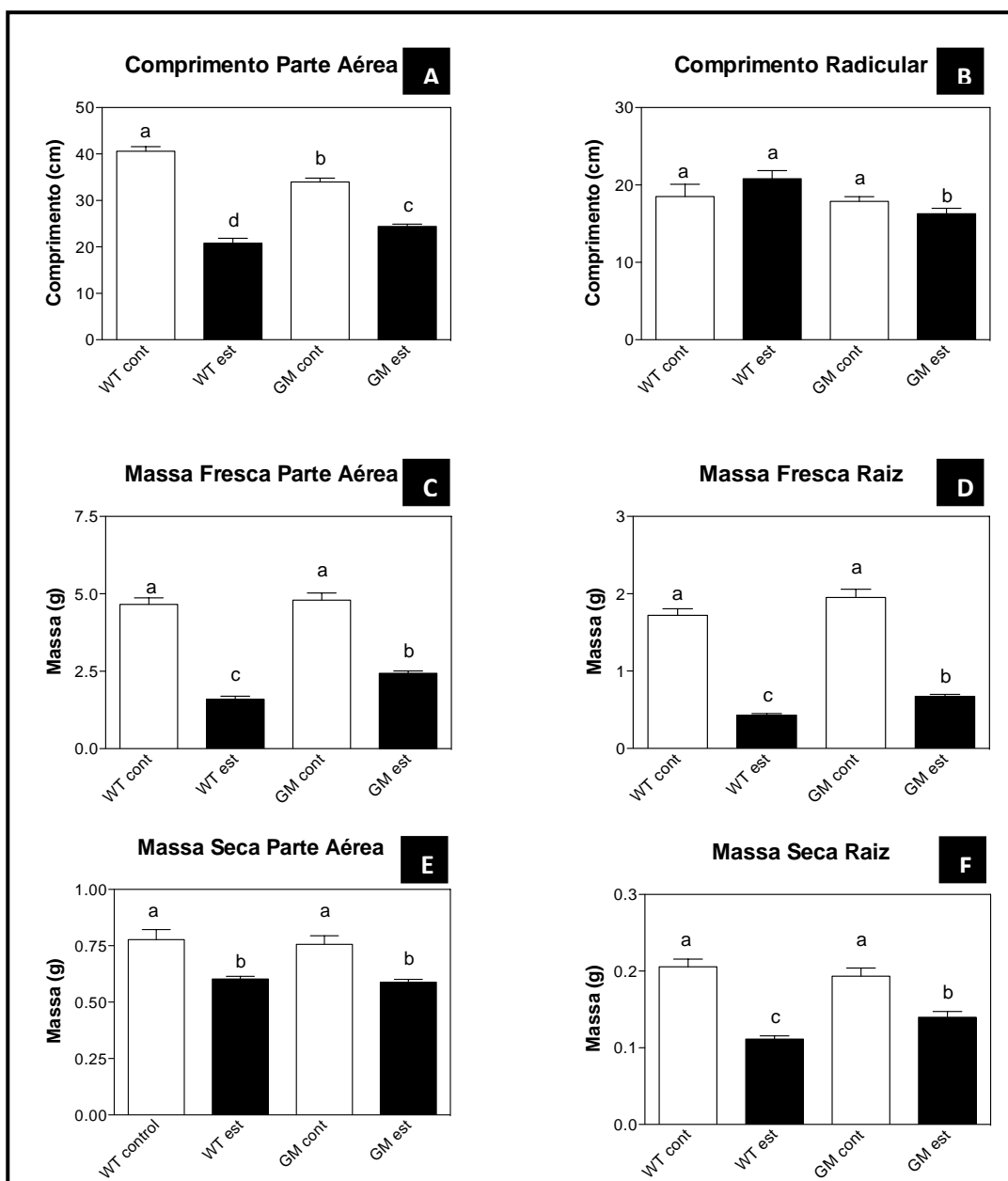


Figura 5: Variações nos parâmetros biométricos analisados nos dois tratamentos: plantas irrigadas (cont) e plantas submetidas ao estresse hídrico (est). (A) Variação do comprimento da parte aérea entre plantas WT e transgênicas. **(B)** Variação do comprimento da parte radicular entre plantas WT e transgênicas. **(C e E)** Variação da massa fresca e seca da parte aérea entre plantas WT e transgênicas. **(D e F)** Variação da massa fresca e seca radicular entre as plantas WT e transgênicas. Médias com letras iguais não se diferenciam estatisticamente conforme Teste de Tukey, a $p < 0,05$.

Foi calculado o Teor Relativo de Água no solo após o estresse para cada tratamento, e os resultados estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2- Cálculo do Teor Relativo de Água no Solo:

TRATAMENTO	WT	TRANSGÊNICA
IRRIGADA	30,65%	30,53%
ESTRESSADA	25,98%	10,27%

As plantas transgênicas provavelmente absorveram mais água durante o estresse, pois havia somente 10,27% de água no solo em comparação com as WT, que possuíam 25,98%. Este resultado pode estar relacionado com o aumento da massa fresca da parte aérea e radicular, que refletia, principalmente no caso da parte aérea, uma maior quantidade de água absorvida do solo e retida nas plantas transgênicas. De forma parecida, as plantas transgênicas de *Arabidopsis* perderam menos água, como observado na figura 1C, o que indica que mais água foi absorvida para manter os níveis na planta mais constantes durante a condição de estresse hídrico (Patente nº WO 2013/116/750 A1).

Dois dias após a re-irrigação das plantas estressadas foi observada uma melhor recuperação das plantas transgênicas comparadas com as WT. Dezar et al. (2005) observaram o mesmo resultado na recuperação de plantas transgênicas de *Arabidopsis* para o gene *HaHB4* submetidas ao estresse hídrico severo.



Figura 6: Resultado prévio da recuperação após o bioensaio de tolerância à seca. Plantas WT e *GmHaHB11* foram submetidas a estresse hídrico severo por 10 dias e posteriormente re-irrigadas por 2 dias para avaliação da recuperação.

6 CONCLUSÃO

O gene *HaHB11* foi clonado no vetor pAHAS e a construção foi utilizada para transformação genética de soja via biobalística. Foram obtidos 14 eventos de transformação, que foram designados com letras do alfabeto de acordo com a ordem em que foram gerados. O primeiro evento foi chamado de planta “A”, o segundo de planta “B” e assim sucessivamente. Foi feito um *Southern blot* com a progênie da segunda geração das plantas da linhagem “A”, e a hibridização com sonda específica para o gene *HaHB11* sugeriu que a construção havia sido inserida em um *locus* único no genoma da soja. Sendo assim, plantas da quarta geração do evento “A” foram submetidas a bioensaios para avaliar a tolerância ao estresse hídrico.

Foram observadas diferenças significativas entre as plantas de soja WT e transgênicas quanto aos parâmetros biométricos de comprimento e massa fresca da parte aérea e massa fresca e seca da raiz, que foram significativamente maiores nas plantas GM após o período de estresse hídrico. Os dados do cálculo do TRA do solo também revelaram que as plantas transgênicas absorveram muito mais água do que seus pares WT durante o estresse. Juntos, estes resultados levam a crer que o transgene promove maior tolerância a seca por permitir que a planta absorva e retenha mais água durante o estresse. Além disso, as plantas transgênicas apresentaram melhor recuperação frente a condição de estresse avaliada.

No entanto, estes resultados ainda precisam ser validados, sendo necessária a realização de ensaios adicionais para determinar com mais precisão o efeito do transgene no fenótipo das plantas.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliação da resposta de um número maior de eventos frente ao estresse hídrico severo
- Realização de RT-PCR para quantificação da expressão do transgene em cada evento, relacionando a taxa de expressão com aumento da tolerância a seca
- Realização de bioensaios para avaliação de tolerância a estresse salino
- Quantificação de ABA nas plantas submetidas ao estresse hídrico
- Avaliar o acúmulo de soluto compatíveis comparando as plantas transgênicas e WT
- Avaliar o desempenho das plantas durante estresse hídrico utilizando IRGA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, F. J. L., SAROKIN, L., VIANNA, G. R., RECH, E. L. (2000). **Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at high frequency.** *Theoretical and Applied Genetics*, v. 101, p. 1-6.

ARGENTA, G., DA SILVA, P.R.F., BORTOLINI, C.G., FORSTHOFER, E.L., STRIEDER, M.L. (2001). **Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível na folha de milho.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 13, p. 158-167.

ARCE, A. L., RAINERI, J., CAPELLA, M., CABELLO, J. V, & CHAN, R. L. (2011). **Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors: a potential source of functional diversity.** *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 42, p. 1-19.

ARIEL, F. D., MANAVELLA, P. A, DEZAR, C. A, & CHAN, R. L. (2007). **The true story of the HD-Zip family.** *Trends in plant science*, v.12, n.9, p. 419-426.

ARIEL, F., DIET, A., VERDNAUD, M., & CRESPI, M. (2010). **Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1,** *The Plant Cell*, v. 22, p. 2171–2183.

BAIMA, S., POSSENTI, M., MATTEUCCI, A., WISMAN, E., ALTAMURA, M. M., RUBERTI, I., MORO, P. A. (2001). **The Arabidopsis ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems,** *Plant Physiology*, v. 126, p. 643–655.

BJÖRKMAN & DEMMIG. (1987). **Plant yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins.** *Planta*, v. 170, p. 489–504.

BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. (1998). **Manual de transformação genética de plantas.** Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, Brasília.

CHAN, R. L.; GAGO, G. M.; PALENA, C. M.; GONZALEZ, D. H. (1998). **Homeoboxes in plant development.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1442, p. 1–19.

CHEN, L., WEN-BIN, L., & XIN-AN, Z. (2012). **Regulatory Network of Transcription Factors in Response to Drought in Arabidopsis and Crops.** *Journal of Northeast Agricultural University* (English Edition), v. 19, n.3, p. 1–13.

CONAB (Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xls>>. Acesso em: 2 de dezembro 2013.

DEZAR, C.A., FEDRIGO, G.V., CHAN, R.L. (2005). **The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene Hahb4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA**. *Plant Science*, v. 169, p. 447–459.

DOGAN, E., KIRNAK, H., COPUR, O. (2007). **Deficit irrigations during soybean reproductive stages and CROPGRO - soybean simulations under semi-arid climatic conditions**. *Field Crops Research*, v. 103, p. 154 – 159.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2013). Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 3 de dezembro de 2013

FACTS, S. (2013). **Soy Stats 2013** ®.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. (2007). **Ecofisiologia da Soja**. Londrina:Embrapa Soja. Circular Técnica, v. 48, 9p.

FINKELSTEIN, R.R., GAMPALA, S.S.L. AND ROCK, C.D. 2002. **Abscisic acid signaling in seeds and seedlings**. *Plant Cell*, v. 14, p. 15-45.

GAGO, G. M., ALMOGUERA, C., JORDANO, J., GONZALEZ, D. H., & CHAN, R. L. (2002). **HaHB-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower**. *Plant, Cell and Environment*, v. 25, p. 633–640.

GONÇALVES, E.R., FERREIRA, V.M., SILVA, J.V., ENDRES, L., BARBOSA, T.P., DUARTE, W.G. (2010). Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedade de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, p. 378-386.

HENRIKSSON, E., OLSSON, A.S.B., JOHANNESON, H., JOHANSSON, H., HANSON, J., ENGSTRÖM, P., AND SÖDERMAN, E. (2005). **Homeodomain Leucine Zipper Class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships**. *Plant Physiology*. v. 139, p. 509–518.

HIMMELBACH, A., HOFFMANN, T., LEUBE, M., HÖHNER, B. AND GRILL, E. (2002). **Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis**. *Embo Journal*, v. 21, p. 3029–3038.

HJELLSTRÖM, M., OLSSON, A.S.B., ENGSTRÖM, P. AND SÖDERMAN, E. (2003). **transgenic *Arabidopsis* causes a suppression of stem elongation growth.** *Plant, Cell and Environment*, v. 26, p. 1127–1136.

JAIN, M. (2013). **Emerging Role of Metabolic Pathways in Abiotic Stress Tolerance.** *Plant Biochemistry & Physiology*, v. 1, n. 2, p. 1–2.

KASUGA, M., LIU, Q., MIURA, S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AND SHINOZAKI, K. (1999). **Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor.** *Nat. Biotechnol*, v.17, p. 287–291
LEE, G.A., CRAWFORD, G. W., LIU, L., SASAKI, Y., & CHEN, X. (2011). **Archaeological soybean (*Glycine max*) in East Asia: does size matter?** *PLoS one*, v. 6, n. 11, e26720.

LU, D.; ZHANG, J. (1999). **Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants.** *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 50, n. 336, p. 1199-1206.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. (1997). **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações.** 2. ed. Piracicaba: Potafos,. 319 p.

MANAVALAN, L. P., GUTTIKONDA, S. K., TRAN, L.-S., & NGUYEN, H. T. (2009). **Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean.** *Plant & Cell Physiology*, v. 50, n. 7, p. 1260–76.

MANAVELLA, P.A., ARCE, A.L., DEZAR, C.A., BITTON, F., RENOU, J.P., CRESPI, M., CHAN, R.L. (2006) **Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower HaHB-4 transcription factor.** *Plant Journal*, 48:125-137.

MANAVELLA, P.A., DEZAR, C.A., ARIEL, F.D., DRINCOVICH, M.F., CHAN, R.L. (2008a) **The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up regulated in darkness acting as a repressor of photosynthesis related genes transcription.** *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 3143-3155.

MANAVELLA, P.A., DEZAR, C.A., ARIEL, F.D., AND CHAN, R.L. (2008b). **Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 860–867.

MAXWELL C.; JOHNSON, G. M. (2000). **Chlorophyll fluorescence: a practical guide.** *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, p. 659-668.

MCAUSLAND, L., DAVEY, P. A, KANWAL, N., BAKER, N. R., & LAWSON, T. (2013). **A novel system for spatial and temporal imaging of intrinsic plant water use efficiency.** *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 16, p. 4993–5007.

MORELLI, G., RUBERTI, I., MOLECOLARE, B., SAPIENZA, L., & MORO, P. A. (2000). **Update on Light Signaling Shade Avoidance Responses . Driving Auxin along Lateral Routes.** *Plant Physiology*, v. 122, p. 621–626.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiol Plant*, v. 15, p. 473-497.

NAKAMURA, M., KATSUMATA, H., ABE, M., YABE, N., KOMEDA, Y., YAMAMOTO, K. T., & TAKAHASHI, T. (2006). **Characterization of the Class IV Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family in Arabidopsis.** *Plant Physiology*, v. 141, p. 1363–1375.

OLSSON, A.S., ENGSTROM, P., AND SODERMAN, E. (2004). **The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis.** *Plant Molecular Biology*, v. 55, p. 663–677.

PRIGGE, M. J., & OTSUGA, D. (2005). **Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in Arabidopsis Development.** *The Plant Cell*, v. 17, p. 61–76.

RECH, E.L., VIANNA, G.R., & ARAGÃO, F.J.L. (2008). **High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants.** *Nature protocols*, v. 3, n. 3, p. 410 - 418.

REGUERA, M., PELEG, Z., & BLUMWALD, E. (2012). **Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1819, p. 186–194.

RIVERO, R.M., KOJIMA, M., GEPSTEIN, A., SAKAKIBARA , H., MITTLER, R., GEPSTEIN, S. (2007). **Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plants.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 4, p. 19631 – 19636.

RUEDA, E.C., DEZAR, C.A., GONZALEZ, D.H., CHAN, R.L. (2005). **Hahb-10, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is regulated by light quality and quantity, and promotes early flowering when expressed in Arabidopsis.** *Plant and Cell Physiology*, v. 46, p. 1954–1963.

RUSHTON, P.J., SOMSSICH, I.E., RINGLER, P., & SHEN, Q.J. (2010). **WRKY transcription factors.** *Trends in plant science*, v. 15, p. 247–258.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (2001). **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SCHOLES, J. D.; HORTON, P. (1993). **Photosynthesis and chlorophyll fluorescence: simultaneous measurements**. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. (Eds.). *Methods in comparative plant ecology: a laboratory manual*. London: Chapman & Hall, p. 130-135.

SHIN, D., KOO, Y.D., LEE, J., LEE, H.J., BAEK, D., LEE, S., CHEON, C.I., KWAK, S.S., LEE, S.Y., YUN, D.J. (2004). **AtHB-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from Arabidopsis thaliana, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion**. *Biochemistry Biophysics Research Community*, v. 323, p. 534-540.

SHOEMAKER, R. C.; POLZIN, K.; LABATE, J.; SPECHT, J.; BRUMMER, E. C.; OLSON, T.; YOUNG, N. D.; CONCIBIDO, V. C.; WILCOX, J.; TAMULONIS, J. P.; KOCHERT, G.; BOERMA, H. R. (1996). **Genome Duplication in Soybean (Glycine Subgenus Soja)**. *Genetics*, v. 144, p. 329-338.

SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (1997). **Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response**. *Plant Physiology*, v. 115, p. 327-334.

SINCLAIR, T. R., & RUFTY, T. W. (2012). **Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics**. *Global Food Security*, v. 1, n. 2, p. 94-98.

SIRICHANDRA, C., WASILEWSKA, A., VLAD, F., VALON, C., LEUNG, J. (2009). **The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action**. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 1439-63

SÖDERMAN, E., MATTSSON, J. AND ENGSTRÖM, P. (1996). **The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid**. *Plant Journal*, v. 10, p. 375-381.

SON, O., HUR, Y.S., KIM, Y.K., LEE, H.J., KIM, S., KIM, M.R., NAM, K.H., LEE, M.S., KIM, B.Y., PARK, J., PARK, J., LEE, S.C., HANADA, A., YAMAGUCHI, S., LEE, I.J., KIM, S.K., YUN, D.J., SÖDERMAN, E., CHEON, C.I. (2010). **ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of Arabidopsis, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a GA 20-oxidase gene**. *Plant Cell Physiology*, v. 51, p. 1537-1547.

SOUZA, R.P., RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F., SILVEIRA, J.A.G. (2005). **Photosynthetic responses of Young cashew plants to varying environmental conditions.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 40, p. 735-744.

SÖDERMAN, E., MATTSSON, J. AND ENGSTRÖM, P. (1996). **The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid.** *Plant Journal*, v. 10, p. 375–381.

SPECHT, J.E., HUME, D.J., KUMUDINI, S.V. (1999). **Soybean yield potential - a genetic and physiological perspective.** *Crop Science*, v. 39, p. 1560 – 1570.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TRAN, L. P., NAKASHIMA, K., SAKUMA, Y., SIMPSON, S. D., FUJITA, Y., MARUYAMA, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2004). **Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis -Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter.** *The plant cell on line*, v. 16, p. 2481–2498.

TU et al. (2004). **Weed Control Methods Handbook**, The Nature Conservancy, *Imazapyr*, v. 7, p. 1–7.

UMEZAWA, T., FUJITA, M., FUJITA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., & SHINOZAKI, K. (2006). **Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future.** *Current opinion in biotechnology*, v. 17, p. 113–22.

WANG, Y., HENRIKSSON, E., SÖDERMAN, E., NORDIN HENRIKSSON, K., SUNDBERG, E. AND ENGSTRÖM, P. (2003). **The Arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis.** *Developmental Biology*, v. 264, p. 228–239.

ZHANG, S., HAIDER, I., KOHLEN, W., JIANG, L., & OUWERKERK, C.L.P.B.F., (2012). **Function of the HD-Zip I gene Oshox22 in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice.** *Plant Molecular Biology*, v. 80, p. 571–585.