



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

Tolerância ao estresse hídrico em tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), modificados para expressar os genes *MdGolS2* e *MdDHN11* de macieira (*Malus domestica* Borkh)

Juliane Costa Cabral

Brasília-DF

2026



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

Tolerância ao estresse hídrico em tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.), modificados para expressar os genes *MdGolS2* e *MdDHN11* de macieira (*Malus domestica* Borkh)

Juliane Costa Cabral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular.

Orientador: Francisco José Lima Aragão

Brasília-DF
2026

*Dedico este trabalho ao meu
filho Lucas♥*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e perseverança para enfrentar os desafios desta jornada e por me permitir alcançar esta importante conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão, pela confiança, orientação, apoio e ensinamentos ao longo dos anos de doutorado. Agradeço pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todas as contribuições que foram fundamentais para minha formação científica e profissional.

Ao Dr. Luís Fernando Revers, da Embrapa Uva e Vinho, pela colaboração científica e pelas contribuições que motivaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do doutorado e por proporcionarem um ambiente de aprendizado, crescimento e desenvolvimento acadêmico.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infraestrutura, suporte técnico e ambiente de excelência científica que possibilitaram a execução deste trabalho.

Às instituições de fomento à pesquisa, especialmente ao CNPq e à FAPDF, pelo apoio à ciência e à formação de pesquisadores no Brasil.

Aos pesquisadores, técnicos, estudantes e colegas do Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical, pela convivência, apoio, colaboração e troca de conhecimentos ao longo desta trajetória.

Um agradecimento especial à Layza, pela dedicação, parceria e apoio durante a realização de grande parte dos experimentos deste trabalho. Sua dedicação e comprometimento foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Natália Lima, amiga e colega de laboratório, agradeço pela valiosa colaboração na condução dos experimentos deste trabalho, pela disposição em compartilhar conhecimentos e pela experiência que contribuiu para a solução de dúvidas e desafios ao longo desta jornada.

À Lídia, amiga e colega de laboratório, agradeço pela companhia, apoio e amizade ao longo destes anos. Seus conselhos, incentivos e contribuições foram extremamente importantes para o desenvolvimento deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

À Elínea, amiga e colega de laboratório, minha gratidão por me acompanhar nos primeiros passos no laboratório e no início do doutorado. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e por todo o conhecimento compartilhado, que foram fundamentais para minha formação e para a construção desta trajetória.

Aos meus familiares, pelo amor, incentivo, orações e compreensão ao longo desta jornada. Agradeço especialmente ao meu marido, Antonio, e à minha mãe, Ivanete, pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo incentivo constante. Esta conquista também pertence a vocês.

A todos os amigos que estiveram presentes ao longo desta caminhada, agradeço pelo apoio, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de amizade que tornaram o percurso mais leve.

Ao meu filho, Lucas, a quem dedico este trabalho. Sua chegada transformou minha vida e me ensinou o verdadeiro significado da força, da coragem e do amor incondicional. Você foi minha maior inspiração e motivação para superar os desafios desta jornada. Esta conquista também é sua.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação como pesquisadora e como ser humano.

Muito obrigada.

RESUMO

A seca é um dos principais fatores abióticos que limitam a produção agrícola, sendo seus impactos agravados pelas mudanças climáticas. No tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), o déficit hídrico compromete o crescimento, a produção e a qualidade dos frutos. Nesse contexto, o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca constitui uma estratégia importante para a manutenção da produção agrícola. Este trabalho teve como objetivo desenvolver plantas transgênicas de tomate expressando os genes *MdDHN11* (gene codificador de desidrina) e *MdGolS2* (gene codificador da galactinol sintase), associados à tolerância ao déficit hídrico. Para isso, foram construídos vetores de transformação contendo os genes de interesse e introduzidos em explantes cotiledonares da cultivar Micro-Tom por meio de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. A integração dos transgenes nas plantas regeneradas foi confirmada por PCR. A metodologia empregada resultou na obtenção de dez (10) eventos transgênicos contendo o gene *MdGolS2* e sete eventos contendo o gene *MdDHN11*. As análises de expressão gênica por RT-qPCR revelaram maior expressão de *MdGolS2* na linhagem 2, enquanto as linhagens 13 e 14 apresentaram os maiores níveis de expressão de *MdDHN11*. As plantas transgênicas expressando *MdGolS2* foram submetidas a 12 dias de déficit hídrico juntamente com plantas não transgênicas (WT). A linhagem 2 apresentou desempenho superior sob estresse, mantendo maiores valores de eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e potencial hídrico foliar, além de maior produção em comparação às plantas WT. As plantas expressando *MdDHN11* também foram avaliadas sob déficit hídrico por 10 dias, e as linhagens 13 e 14 apresentaram melhor desempenho fisiológico em relação às plantas não transgênicas. Os resultados demonstram que a expressão dos genes *MdGolS2* e *MdDHN11* contribui para o aumento da tolerância ao déficit hídrico em plantas de tomate, evidenciando seu potencial para aplicação em programas de melhoramento genético e biotecnologia voltados à adaptação das culturas às mudanças climáticas.

Palavra-chave: *Solanum lycopersicum*; Déficit hídrico; superexpressão gênica; transgenia; plantas geneticamente modificadas

ABSTRACT

Drought is one of the main abiotic factors limiting agricultural productivity, and its impacts are being intensified by climate change. In tomato (*Solanum lycopersicum* L.), water deficit adversely affects plant growth, fruit yield, and fruit quality. Therefore, the development of drought-tolerant cultivars is an important strategy to sustain agricultural production under increasingly adverse environmental conditions. The objective of this study was to develop transgenic tomato plants expressing the *MdDHN11* and *MdGolS2* genes, which are associated with drought tolerance. To achieve this, transformation vectors carrying the genes of interest were constructed and introduced into cotyledon explants of the Micro-Tom cultivar through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. Transgene integration in regenerated plants was confirmed by PCR analysis. The transformation protocol resulted in the generation of 10 independent transgenic events carrying *MdGolS2* and seven events carrying *MdDHN11*. RT-qPCR analysis revealed that line 2 exhibited the highest expression level of *MdGolS2*, whereas lines 13 and 14 showed the highest expression levels of *MdDHN11*. Transgenic plants expressing *MdGolS2* were subjected to 12 days of water deficit along with non-transgenic control plants (WT). Line 2 showed superior performance under drought conditions, maintaining higher maximum photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm), higher leaf water potential, and greater fruit yield compared with WT plants. Transgenic plants expressing *MdDHN11* were also evaluated under water deficit for 10 days, and lines 13 and 14 exhibited improved physiological performance relative to non-transgenic plants. Overall, the results demonstrate that the expression of *MdGolS2* and *MdDHN11* enhances drought tolerance in tomato plants, highlighting the potential of these genes for application in breeding and biotechnology programs aimed at improving crop adaptation to climate change.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; drought tolerance; genetic transformation; dehydrin; galactinol synthase; water deficit.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Via metabólica do galactinol e RFO até a estaquiose.....	18
Figura 2. Representação esquemática do vetor binário, com o cassete de expressão do gene <i>MdGo/S2</i> : promotor 35SCaMV com enhancer AMV, terminador nos3'; gene marcador de seleção <i>nptII</i> dirigido pelo promotor 35SCaMV, terminador 35SCaMV. O Backbone do plasmídeo é o PCAMBIA2300.....	28
Figura 3: Produtos de amplificação do gene <i>MdGo/S2</i> da geração F ₀ visualizados em transiluminador. M: Marcador Molecular 1kb. Poços numerados: DNA de plantas transgênicas de <i>MdGo/S2</i> F ₀ .. WT: Controle negativo (DNA de planta WT). C+: Controle positivo contendo DNA plasmidial).....	32
Figura 4. PCR quantitativa em tempo real para quantificar a expressão do transgene <i>MdGo/S2</i> nas folhas de cinco linhagens transgênicas e controle (WT).....	34
Figura 5. Eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) de linhagens transgênicas e não transgênicas (WT) avaliadas sob condições de déficit hídrico de 12 dias.....	35
Figura 06. Redução progressiva no conteúdo relativo de água (RWC) ao longo de um período de 72 h.....	36
Figura 7. Potencial hídrico foliar (Ψ_w) de linhagens transgênicas (L2, L4, L10, L14 e L18; geração F ₂) e não transgênicas (WT) sob déficit hídrico por 12 dias. A reidratação foi realizada no 12º dia e as plantas foram avaliadas novamente quatro dias depois (16º dia). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas observadas nas linhagens transgênicas em comparação com o controle (** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001, n=9).....	37
Figura 8. Aspecto fenotípico das plantas WT não transgênicas (esquerda) e da linhagem transgênica estável L2 (direita, geração F ₂) após o ensaio de estresse hídrico. As plantas foram mantidas sob estresse hídrico por 12 dias, irrigadas novamente e fotografadas 15 dias após a irrigação.....	38
Figura 9. Efeito do estresse hídrico na produção de frutos de plantas não transgênicas (WT) e transgênicas expressando o transgene <i>MdGo/S2</i> . Massa total de frutos produzidos por planta cultivada sob irrigação normal (a) e em condições de déficit hídrico (b). A produção de frutos das plantas L2 foi significativamente maior do que a das plantas não transgênicas sob estresse hídrico (** p<0,001, n=5).....	39
Figura 10. Representação esquemática do vetor binário GS71412-1 DHN11, com o cassete de expressão do gene <i>MdoDHN11</i> : promotor 35SCaMV, com enhancer	

AMV, terminador nos3', e gene marcador de seleção *nptII*. dirigido pelo promotor 35SCaMV, terminador 35SCaMV.
.....52

Figura 11. Detecção do transgene MdDHN11 em plantas da geração F₀ por PCR. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV após eletroforese em gel. M: marcador de peso molecular de 1 kb; poços numerados: eventos transgênicos F₀; C-: DNA de planta WT utilizado como controle negativo; C+: DNA plasmidial contendo o gene MdDHN11, utilizado como controle positivo.....59

Figura 12. PCR quantitativa em tempo real para quantificar a expressão do transgene MdDHN11 nas folhas de cinco linhagens transgênicas e controle (WT).....61

Figura 13. Eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) de linhagens transgênicas e não transgênicas (WT) avaliadas sob condições de déficit hídrico de 9 dias.....62

Figura 14. Potencial hídrico foliar (Ψ_w) de linhagens transgênicas (DHN11-1, DHN11-2, DHN11-3, DHN11-9, DHN11-13 e DHN11-14; geração F₂) e não transgênicas (WT) sob déficit hídrico por 9 dias. A reidratação foi realizada no 9º dia e as plantas foram avaliadas novamente quatro dias depois (13º dia). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas observadas nas linhagens transgênicas em comparação com o controle (** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001, n=9).....63

Figura 15. Aspecto fenotípico das plantas WT não transgênicas (esquerda) e da linhagem transgênica estável DHN11-13 (direita, geração F₂) após o ensaio de estresse hídrico. As plantas foram mantidas sob estresse de irrigadas novamente e fotografadas quatro dias após a irrigação.....64

Figura 16. Efeito do estresse hídrico na produção de frutos de plantas não transgênicas (WT) e transgênicas expressando o transgene DHN11. Massa total de frutos produzidos por planta cultivada sob irrigação normal (a) e em condições de déficit hídrico (b).....65

Tabela 1. Primers utilizados para análises de RT-PCR.....30

Tabela 2. Análise de segregação do gene *MdGolS2* em linhagens transgênicas F₁.....33

Tabela 3 - Primers utilizados para a detecção da sequência de DNA do transgenes *MdDHN11*.....55

Tabela 4. Primers utilizados para análises de RT-PCR.....56

Tabela 5. Análise de segregação do gene DHN11 em linhagens transgênicas F₁....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMV – *Alfalfa Mosaic Virus*

bp – Pares de bases

CaMV – *Cauliflower Mosaic Virus*

cDNA – DNA complementar

DHN – *Dehydrin* (Desidrina)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DW – *Dry Weight* (Peso seco)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EF-1 α – Fator de elongação 1 alfa

F₀ – Primeira geração de plantas transformadas (transformantes primários)

F₁ – Primeira geração de progênie

F₂ – Segunda geração de progênie

F_m – Fluorescência máxima

F_v – Fluorescência variável

F_v/F_m – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II

FW – *Fresh Weight* (Peso fresco)

GalS – *Galactinol sintase*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LEA – *Late Embryogenesis Abundant*

MdDHN11 – Gene de desidrina de *Malus domestica*

MdGolS2 – Gene de galactinol sintase de *Malus domestica* nptII – *Neomycin phosphotransferase II*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PSII – Fotossistema II

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RFOs – Oligossacarídeos da família da rafinose (*Raffinose Family Oligosaccharides*)

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa após Transcrição Reversa (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RWC – Teor relativo de água (*Relative Water Content*)

SYBR Green – Corante fluorescente utilizado em PCR em tempo real

TBE – Tris-Borato-EDTA

TW – *Turgid Weight* (Peso túrgido)

UV – Ultravioleta

WT – *Wild Type* (Tipo selvagem)

Ψ_w – Potencial hídrico foliar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
Capítulo I.....	24
a. 1.INTRODUÇÃO.....	25
b. 2. OBJETIVOS.....	27
i. 2.1 Objetivo Geral.....	27
ii. 2.2 Objetivos Específicos.....	27
c. 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
i. 3.1 Construção do vetor de transformação de plantas.....	28
ii. 3.2 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e de tomate.....	28
iii. 3.3 Triagem de plantas transgênicas.....	29
iv. 3.4 Análise de progênie.....	29
v. 3.5 Análise quantitativa RT-PCR em Tempo real.....	29
vi. 3.6 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm).....	30
vii. 3.7 Potencial hídrico das folhas e teor relativo de água (RWC).....	30
viii. 3.8 Ensaio de tolerância à seca e análises fisiológicas.....	31
ix. 3.9 Quantificação da produção.....	31
d. 4 RESULTADOS.....	32
i. 4.1 Transformação de plantas.....	32
ii. 4.2 Análise de progênie.....	33
iii. 4.3 Análise de RT-qPCR.....	33
iv. 4.4 Eficiência fotoquímica.....	34

v.	4.5 Teor relativo de água foliar e Potencial hídrico.....	35
vi.	4.6 Quantificação da produção.....	38
e.	5. DISCUSSÃO.....	40
f.	6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
Capítulo II.....		48
g.	1.INTRODUÇÃO.....	49
h.	2. OBJETIVOS.....	51
i.	2.1 Objetivo Geral.....	51
ii.	2.2 Objetivos Específicos.....	51
i.	3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
i.	3.1 Construção de vetores para transformação de tomate..	52
ii.	3.2 Transformação genética da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
iii.	3.3 Transformação genética de tomateiro via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
iv.	3.4 Extração de DNA genômico e PCR.....	54
v.	3.5 Análise de progênie.....	55
vi.	3.6 Análise quantitativa de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).....	55
vii.	3.7 Ensaio de tolerância à seca e análises fisiológicas.....	56
viii.	3.8 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm).....	57
ix.	3.9 Potencial hídrico das folhas.....	57
x.	3.10 Quantificação da produção.....	58
xi.	3.11 Análise estatística.....	58

j.	4. RESULTADOS.....	59
i.	4.1 Transformação genética de tomate.....	59
ii.	4.2 Análise de progênie.....	59
iii.	4.3 Análise de RT-qPCR.....	60
iv.	4.4 Eficiência fotoquímica.....	61
v.	4.5 Quantificação da produção.....	65
k.	5. DISCUSSÃO.....	66
l.	6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	72

INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas têm intensificado a ocorrência e a severidade de secas prolongadas, que representam uma das principais ameaças à produção agrícola no mundo (Ortiz-Bobea et al., 2021; Rezaei et al., 2023; Li et al., 2026). A seca é considerada o estresse abiótico que mais limita o desempenho das plantas, afetando processos fisiológicos e metabólicos essenciais e comprometendo significativamente o crescimento, o desenvolvimento e a produção das culturas (Vicente-Serrano et al., 2022; Haghpanah et al., 2024; Li et al., 2024).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é particularmente sensível ao déficit hídrico, uma vez que a redução da disponibilidade de água compromete diversos processos fisiológicos e metabólicos, resultando na diminuição do crescimento vegetativo e da produção de frutos. Dessa forma, a seca constitui um dos principais fatores limitantes ao desempenho produtivo da cultura (Chen et al., 2014; Chowdhury et al., 2023; Li et al., 2024).

O tomateiro é uma espécie diplóide, anual, predominantemente autógama, pertencente à família Solanaceae, com número cromossômico $2n = 2x = 24$ (Jenkins, 1948; Peralta et al., 2008). Revisões filogenéticas recentes reintegraram o antigo gênero *Lycopersicon* ao gênero *Solanum* (Peralta et al., 2008). Originário da região andina da América do Sul, seu principal centro de domesticação encontra-se no México (Stevens, 2012).

O tomate destaca-se entre as hortaliças de maior importância econômica e nutricional no mundo. Em 2023, a produção global da cultura ultrapassou 189 milhões de toneladas, distribuídas em aproximadamente 5 milhões de hectares cultivados (FAOSTAT, 2026). No Brasil, o tomate apresenta expressiva relevância para o setor agrícola, com produção anual superior a 4 milhões de toneladas e área cultivada próxima de 60 mil hectares, posicionando o país entre os principais produtores mundiais (IBGE, 2025; FAOSTAT, 2026).

Além da importância econômica, o tomate possui elevado valor nutricional, sendo uma importante fonte de vitamina C, potássio, ácido fólico e carotenóides, especialmente o licopeno, composto associado à atividade antioxidante e à promoção da saúde humana (Egea et al., 2022; Li et al., 2024; Szabo et al., 2025). Devido ao seu baixo valor calórico e à ampla versatilidade culinária, os frutos são consumidos tanto *in natura* quanto processados na forma de molhos, extratos,

concentrados, sucos, sopas, purês e ketchup, constituindo matéria-prima essencial para diversos segmentos da indústria alimentícia (Liadakis e Tzia, 2022; Salniță e Farcaș, 2024).

Diante das projeções de aumento da frequência e da intensidade dos eventos de seca, o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico constitui uma estratégia essencial para reduzir os impactos desse estresse sobre a produção agrícola. Entre as abordagens utilizadas para aumentar a tolerância das plantas ao estresse hídrico, destaca-se a engenharia genética, que permite a introdução e a modulação da expressão de genes envolvidos em mecanismos de proteção celular, ajuste osmótico e manutenção da homeostase hídrica, contribuindo para o aumento da tolerância das plantas à seca (Haghpanah et al., 2024; Wang et al., 2025).

Nesse contexto, genes associados à proteção celular durante condições de desidratação têm despertado grande interesse, entre os quais se destacam aqueles que codificam as desidrinas (DHNs), proteínas amplamente relacionadas à tolerância a diferentes estresses abióticos. As desidrinas (DHNs) são uma família de proteínas vegetais que ganharam atenção considerável nos últimos anos devido aos seus papéis no desenvolvimento de sementes e na tolerância aos estresses abióticos (Melgar e Zelada, 2021; Riyazuddin et al., 2022; Korotaeva et al., 2024). As DHNs são proteínas do grupo II da família de proteínas denominadas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), que se acumulam em estágios tardios do desenvolvimento da semente (Galau et al., 1986; Banerjee e Roychoudhury, 2016; Melgar e Zelada, 2021). Essas proteínas possuem estrutura altamente hidrofílica e desordenada, característica relacionada às suas funções protetoras em condições de desidratação celular (Garay-Arroyo et al., 2000; Liu et al., 2017).

As DHNs apresentam segmentos conservados denominados K, Y e S, utilizados na classificação estrutural dessas proteínas (Liu et al., 2017; Melgar e Zelada, 2021). Sob condições de déficit hídrico e outros estresses abióticos, as DHNs contribuem para a estabilização de membranas biológicas, proteínas e enzimas celulares, além de atuarem como sequestradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Halder et al., 2016). A superexpressão de genes DHN tem sido associada ao aumento da tolerância à seca em diversas espécies vegetais, reforçando o potencial dessas proteínas no desenvolvimento de plantas resistentes ao déficit hídrico (Riyazuddin et al., 2022). Em maçã (*Malus domestica* Borkh.), o gene *MdDHN11* apresentou elevada expressão em tecidos submetidos ao déficit

hídrico, estando associado à proteção celular durante processos de desidratação (Falavigna et al., 2019). Estudos realizados com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando *MdDHN11* demonstraram maior tolerância ao estresse hídrico severo, confirmando a importância funcional das desidrinas na resposta ao déficit hídrico (Falavigna et al., 2019).

Além das proteínas protetoras, como as desidrinas, as plantas também utilizam mecanismos metabólicos associados ao ajuste osmótico para tolerar condições de déficit hídrico. Entre esses mecanismos destaca-se o acúmulo de oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs), compostos amplamente relacionados à proteção celular durante a desidratação. A biossíntese desses compostos depende da produção de galactinol, molécula sintetizada pela enzima galactinol sintase (GolS), considerada o principal ponto regulatório da via metabólica dos RFOs (Elsayed et al., 2014; Sengupta et al., 2015). Os RFOs desempenham funções importantes na proteção celular durante condições de estresse abiótico (Vinson et al., 2020; Liu et al., 2022).

Os RFOs são sintetizados pela transferência de resíduos de galactose do galactinol para a sacarose (Figura 1) (Bhattacharya e Kundu, 2020) e acumulam durante os estágios finais de maturação e dessecação das sementes, sendo considerados importantes para a aquisição da tolerância à dessecação, uma vez que a ausência de rafinose compromete esse processo (Brenac et al., 1997).

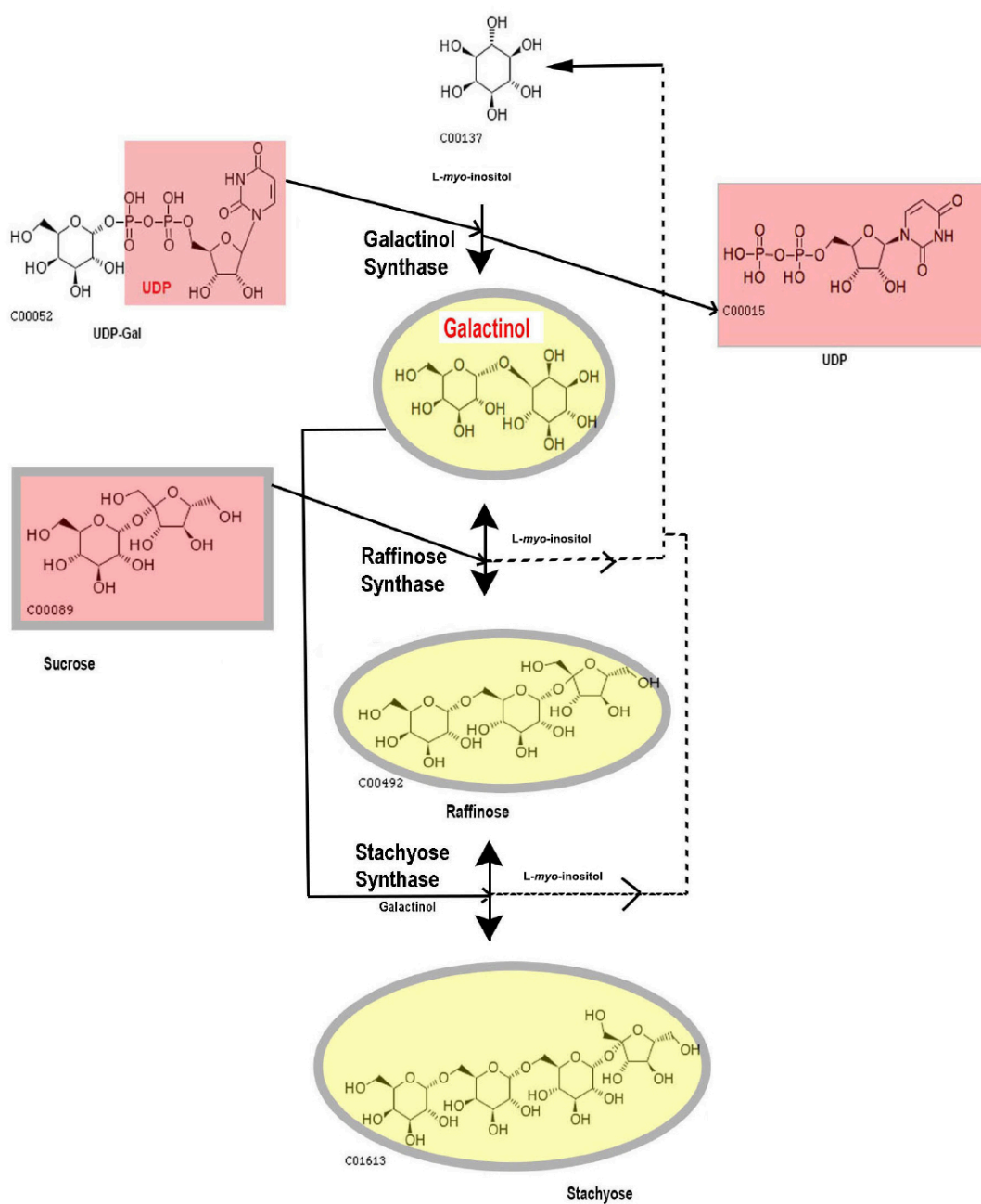


Figura 1. Via metabólica do galactinol e RFO até a estaquiose (Fonte: Sengupta et al., 2015).

Além disso, esses oligossacarídeos também se acumulam em tecidos vegetativos submetidos ao déficit hídrico e a outros estresses ambientais, contribuindo para a manutenção do turgor celular, a estabilização de proteínas e membranas biológicas e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Nishizawa et al., 2008; Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Stoyanova et al., 2011;

Peshev et al., 2013). Diversos estudos demonstram que a superexpressão de genes codificadores de galactinol sintase (GolS) promove maior tolerância à seca (Taji et al., 2002; Selvaraj et al., 2017; Falavigna et al., 2018; Qiu et al., 2020; Koning et al., 2023).

Considerando a relevância econômica do tomateiro, sua elevada sensibilidade ao déficit hídrico e o potencial biotecnológico dos genes *MdDHN11* e *MdGoS2*, este trabalho teve como objetivo gerar e caracterizar plantas transgênicas de tomate expressando constitutivamente esses genes, avaliando seus efeitos sobre mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à tolerância à seca. Espera-se que os resultados contribuam para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas ao aumento da resiliência das culturas agrícolas frente aos desafios impostos pelas mudanças climáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: Structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 1–17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0113-3>.
- BHATTACHARYA, S.; KUNDU, A. Sugars and sugar polyols in overcoming environmental stresses. In: ROYCHOUDHURY, A.; TRIPATHI, D. K. (ed.). *Molecular plant abiotic stress: biology and biotechnology*. Hoboken: Wiley, 2020. p. 71–101.
- BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; LE ROY, K.; XIAO, Y.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, Oxford, v. 277, n. 9, p. 2022–2037, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x>.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize seed development. *Plant Physiology*, Rockville, v. 113, n. 3, p. 689–695, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.689>.
- CHEN, J.; KANG, S.; DU, T.; QIU, R.; GUO, P.; CHEN, R. Modeling relations of tomato yield and fruit quality with water deficit at different growth stages under greenhouse condition. *Agricultural Water Management*, Amsterdam, v. 146, p. 131–148, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.07.023>.
- CHOWDHURY, R. H.; BHATTACHARJEE, A.; CHAKRABORTY, M.; SARKAR, S.; GHOSH, Z. Drought-responsive genes in tomato: Meta-analysis of gene expression using machine learning. *Scientific Reports*, London, v. 13, p. 19374, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46639-0>.
- EGEA, I.; ESTRADA, Y.; FLORES, F. B.; BOLARÍN, M. C. Improving production and fruit quality of tomato under abiotic stress: Genes for the future of tomato breeding for a sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, Amsterdam, v. 204, p. 105086, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105086>.
- ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants. *Plant Biology*, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/plb.12053>.
- FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; BUFON, V. B.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Characterization of the nucellus-specific dehydrin *MdoDHN11* demonstrates its involvement in the tolerance to water deficit. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 38, p. 1069–1084, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02428-8>.
- FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; MIOTTO, Y. E.; SANTOS, H. P.; OLIVEIRA, P. R. D.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Evolutionary diversification of galactinol synthases in Rosaceae: Adaptive roles of galactinol and raffinose during apple bud dormancy. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 69, n. 5, p. 1247–1259, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx451>.

FAOSTAT. *Crops and livestock products*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2026. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/>. Acesso em: 28 maio 2026.

GALAU, G. A.; HUGHES, D. W.; DURE, L. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 7, n. 3, p. 155–170, 1986.

GARAY-ARROYO, A.; COLMENERO-FLORES, J. M.; GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A. A. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 275, n. 8, p. 5668–5674, 2000.

HAGHPANAH, M.; HASHEMIPETROUDI, S. H.; ARZANI, A.; ARANITI, F. Drought tolerance in plants: Physiological and molecular responses. *Plants*, Basel, v. 13, n. 21, p. 2962, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants13212962>.

HALDER, T.; UPADHYAY, S. K.; RAY, S.; YADAV, D. K.; SINGH, A.; DEY, N. Isolation, cloning and characterization of a novel sorghum dehydrin (SbDhn2) protein. *Protoplasma*, Vienna, v. 253, p. 1185–1198, 2016.

IBGE. *Produção Agrícola Municipal (PAM) 2025*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2025.

JENKINS, J. A. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, New York, v. 2, p. 379–392, 1948.

KONING, R. DE; WILS, G.; KIEKENS, R.; ANGENON, G. Impact of drought and salt stress on galactinol and raffinose metabolism in *Phaseolus vulgaris*. *AoB Plants*, Oxford, v. 15, n. 4, p. plad038, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plad038>.

KOROTAEVA, N. E.; POPOVA, E. V.; NIKOLAEVA, M. K.; SUKHAREVA, E. V.; MURATOVA, S. A. The influence of water deficit on dehydrin content in callus culture cells of Scots pine. *Plants*, Basel, v. 13, n. 19, p. 2752, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13192752>.

LI, J.; AI, G.; WANG, Y.; DING, Y.; HU, X.; LIANG, Y.; YAN, Q.; WU, K.; HUANG, R.; CHEN, C.; OUYANG, B.; ZHANG, X.; PAN, Y.; WU, L.; HONG, Z.; ZHANG, J. A truncated B-box zinc finger transcription factor confers drought sensitivity in modern cultivated tomatoes. *Nature Communications*, London, v. 15, p. 8013, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51699-7>.

LI, J.; ZSCHEISCHLER, J.; BEVACQUA, E. Global record-shattering breadbasket droughts emerge from moderately extreme regional events. *Nature Communications*, London, v. 17, p. 2577, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-026-70700-z>.

LIADAKIS, G. N.; TZIA, C. Tomato processing and by-products valorization. In: GALANAKIS, C. M. (ed.). *Tomato processing by-products: bioactive compounds and their applications*. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 1–28.

LIU, Y.; WANG, L.; XING, X.; SUN, L.; PAN, J.; KONG, X.; ZHANG, M.; LI, D. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses.

Frontiers in Plant Science, Lausanne, v. 8, p. 1018, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01018>.

LIU, Y.; ZHANG, L.; MA, J.; MENG, S.; PANG, C.; ZHAO, X.; ZHANG, H.; WANG, S.; XU, T.; HE, Y.; QI, M. Application of galactinol to tomato enhances tolerance to cold and heat stresses. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, Seoul, v. 63, p. 311–323, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00402-6>.

MELGAR, A. E.; ZELADA, A. M. Evolutionary analysis of angiosperm dehydrin gene family reveals three orthologues groups associated to specific protein domains. *Scientific Reports*, London, v. 11, p. 23869, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03284-2>.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, Rockville, v. 147, p. 1251–1263, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.122465>.

ORTIZ-BOBEA, A.; AULT, T. R.; CARRILLO, C. M.; CHAMBERS, R. G.; LOBELL, D. B. Anthropogenic climate change has slowed global agricultural productivity growth. *Nature Climate Change*, London, v. 11, p. 306–312, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01000-1>.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S. *Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon)*. New York: American Society of Plant Taxonomists, 2008.

PESHEV, D.; VERMEULEN, K.; BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; VAN DEN ENDE, W. Induction of raffinose oligosaccharides by abiotic stress in plants. *Journal of Plant Physiology*, Jena, v. 170, n. 1, p. 47–55, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.003>.

QIU, S.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; WANG, W.; LIU, D.; ZHANG, Z.; REN, Y.; LI, Z. Overexpression of *GmGolS2-1*, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 143, n. 3, p. 507–516, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01932-0>.

REZAEI, E. E.; WEBBER, H.; ASSENG, S.; BOOTE, K.; DURAND, J.-L.; EWERT, F.; MARTRE, P.; MCCARTHY, D. S. Climate change impacts on crop productivity. *Nature Reviews Earth & Environment*, London, v. 4, p. 831–846, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43017-023-00491-0>.

RIYAZUDDIN, R.; GUPTA, R.; IQBAL, N.; KHAN, N. A. Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 41, p. 519–545, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02720-6>.

SALNIȚĂ, F.; FARCAȘ, A. C. Tomato processing and health-related bioactive compounds: An updated review. *Foods*, Basel, v. 13, n. 2, p. 315, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13020315>.

SELVARAJ, M. G.; ISHIZAKI, T.; VALENCIA, M.; OGAWA, S.; DEDICOVA, B.; OGATA, T.; YOSHIWARA, K.; MARUYAMA, K.; KUSANO, M.; SAITO, K.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; ISHITANI, M. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnology Journal*, Oxford, v. 15, n. 11, p. 1465–1477, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/pbi.12731>.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BASAK, P.; MAJUMDER, A. L. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharides in plant stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 6, p. 656, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00656>.

STEVENS, M. A. Tomato breeding. In: ATHERTON, J. G.; RUDICH, J. (ed.). *The tomato crop: a scientific basis for improvement*. Dordrecht: Springer, 2012. p. 35–109.

STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, K.; DONCHEVA, S. The role of galactinol and raffinose in plant response to abiotic stress. *General and Applied Plant Physiology*, Sofia, v. 37, n. 3–4, p. 229–240, 2011.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, Oxford, v. 29, n. 4, p. 417–426, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x>.

VICENTE-SERRANO, S. M.; PEÑA-ANGULO, D.; BEGUERÍA, S.; DOMÍNGUEZ-CASTRO, F.; TOMÁS-BURGUERA, M.; NOGUERA, I.; GIMENO-SOTELO, L.; EL KENAWY, A. Global drought trends and future projections. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, London, v. 380, p. 20210285, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0285>.

VINSON, C. C.; MOTA, A. P. Z.; PORTO, B. N.; OLIVEIRA, T. N.; SAMPAIO, I.; LACERDA, A. L.; DANCHIN, E. G. J.; GUIMARÃES, P. M.; WILLIAMS, T. C. R.; BRASILEIRO, A. C. M. Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Scientific Reports*, London, v. 10, p. 15258, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72191-4>.

WANG, S.; HE, P.; WANG, Z.; ZHANG, H.; MENG, S.; QI, M. Galactinol synthase 4 influences plant growth and carbohydrate metabolism in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 220, p. 109484, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109484>.

Capítulo I

Expressão do gene *MdGolS2* em *Solanum lycopersicum* L. visando aumento da tolerância à seca

1. INTRODUÇÃO

A seca é considerada o estresse abiótico de maior impacto sobre o desenvolvimento das plantas (Vicente-Serrano et al., 2022; Li et al., 2024; Wang et al., 2025). A seca agrícola ocorre quando a água disponível no solo ou via irrigação é insuficiente para suprir as necessidades fisiológicas e de crescimento das culturas (Eck et al., 2020). Como a produção de alimentos depende fortemente dos recursos hídricos, os eventos de seca representam uma séria ameaça à produção agrícola em escala global, comprometendo a produção, a estabilidade dos sistemas produtivos e a segurança alimentar (Ortiz-Bobea et al., 2021; Miyamoto; Hackmann, 2025).

O déficit hídrico limita severamente o desenvolvimento e a produção do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), uma cultura de elevada importância econômica e nutricional (Zhao et al., 2021; Badr et al., 2026). Os frutos de tomate constituem uma importante fonte de nutrientes essenciais e compostos fitoquímicos, incluindo vitamina C, potássio, ácido fólico e carotenóides, especialmente o licopeno (Szabo et al., 2025; Li et al., 2024). Além disso, seu baixo teor calórico torna o tomate um alimento amplamente valorizado na dieta humana (Egea et al., 2022).

As mudanças climáticas têm intensificado os impactos da seca na agricultura, aumentando a demanda por cultivares tolerantes ao déficit hídrico como estratégia para mitigar perdas de produção e garantir a segurança alimentar global. Nesse contexto, abordagens biotecnológicas têm demonstrado grande potencial para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca (Suprasanna, 2020; Kraklow et al., 2026). As pesquisas em biotecnologia e melhoramento genético são fundamentais para assegurar a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção agrícola diante de condições ambientais cada vez mais desafiadoras. Assim, os esforços para o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca por meio de estratégias transgênicas são sustentados por metodologias moleculares avançadas direcionadas à modificação de genes específicos, visando aumentar a resiliência das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Krishna et al., 2019; Zahra et al., 2025; Kraklow et al., 2026).

O galactinol é um intermediário-chave na biossíntese dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs), compostos amplamente estudados por sua participação na resposta das plantas aos estresses abióticos (Vinson et al., 2020; Liu et al.,

2022). Durante o estresse hídrico, os RFOs acumulam-se nos tecidos vegetais, atuando como osmólitos compatíveis que promovem o ajuste osmótico, favorecem a manutenção do turgor celular e contribuem para a estabilização de membranas e proteínas, reduzindo os danos causados pela desidratação (Bartels e Sunkar, 2005; Liu et al., 2022a). A formação desses oligossacarídeos inicia-se com a ação da galactinol sintase (GolS), que catalisa a síntese de galactinol a partir de mio-inositol e UDP-galactose. Em seguida, a rafinose é produzida pela rafinose sintase (RS), e a estaquiose é sintetizada pela estaquiose sintase (STS), por meio da transferência sequencial de resíduos de galactose para sacarose e rafinose, respectivamente (Peterbauer et al., 2002; Sanyal et al., 2023).

A superexpressão de *AtGolS2* em *Arabidopsis thaliana* resultou no aumento dos níveis de galactinol e rafinose nas folhas, promovendo maior tolerância à seca (Taji et al., 2002; Bi et al., 2020). Da mesma forma, Falavigna et al. (2018) observaram maiores concentrações de galactinol e rafinose, associadas a uma maior tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando o gene *MdGolS2* (codificador da galactinol sintase 2).

O aumento da tolerância aos estresses abióticos pode ser alcançado por meio do melhoramento genético utilizando técnicas de engenharia genética. O desenvolvimento de plantas tolerantes à seca é especialmente importante diante dos riscos que as mudanças climáticas e as alterações nos padrões de precipitação representam para a produção agrícola. Neste estudo, foram geradas plantas transgênicas de tomate visando à superexpressão constitutiva do gene *MdGolS2* da macieira com o objetivo de aumentar a tolerância ao déficit hídrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver plantas transgênicas de tomate superexpressando o gene *MdGolS2* com o objetivo de aumentar a tolerância ao déficit hídrico.

2.2 Objetivos Específicos

- Transformar geneticamente plantas de tomate para superexpressar o gene *MdGolS2*;
- Realizar a caracterização molecular e biológica de linhagens geneticamente modificadas;
- Analisar a segregação dos genes exógenos nas linhagens das plantas transgênicas;
- Desafiar as linhagens transgênicas de tomate *MdGolS2* em ensaios de estresse hídrico;
- Realizar análises fisiológicas das linhagens transgênicas de tomate *MdGolS2* durante o período de déficit hídrico;
- Avaliar a produção de linhagens transgênicas (e controle) sob déficit hídrico;
- Comparar a produção de linhagens transgênicas e controle sob condições de irrigação plena.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados no presente estudo foram conduzidos no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

3.1 Construção do vetor de transformação de plantas

A sequência codificadora do gene *MdGoIS2* (número de acesso GenBank KY475540) foi sintetizada pela empresa Epoch Life Science Inc. (GS71412-2, Missouri City, TX, EUA). O DNA sintético foi inserido entre os sítios de restrição *NcoI*/*SacI* do vetor pBI426 (Datla et al., 1991), substituindo o gene de fusão *gus:nptII*. O cassete de expressão foi transferido para o pCAMBIA2300 utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* para gerar o vetor pGoIS2NPTII (Figura 2), usado para transformar a cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação. O vetor pGoIS2NPTII foi utilizado para a transformação de tomate (cv. Micro-Tom) de acordo com Sun et al. (2006).

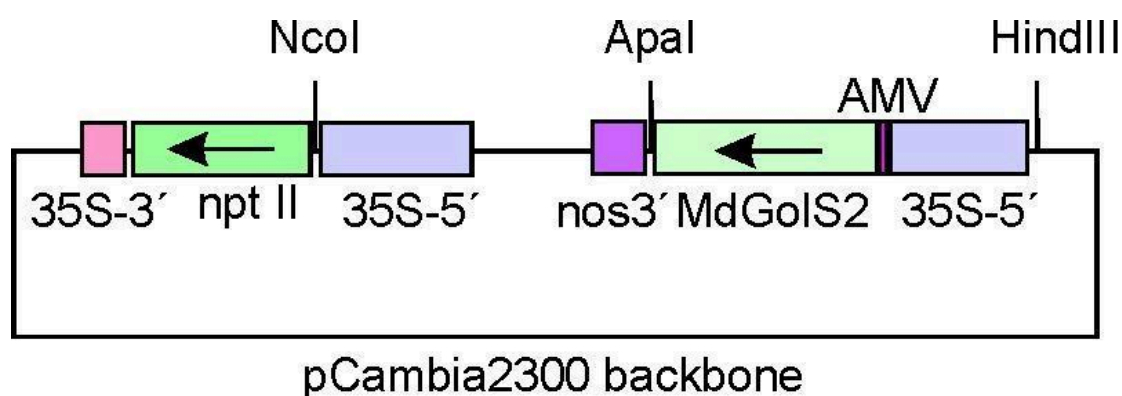


Figura 2: Representação esquemática do vetor binário com o cassete de expressão do gene *MdGoIS2*: Promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (35SCaMV) com sequência enhancer do vírus do mosaico da alfafa (AMV), terminador do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens* (*nos3'*); gene marcador de seleção *nptII* dirigido pelo promotor 35SCaMV, terminador 35SCaMV. O *backbone* do plasmídeo é o PCAMBIA2300.

3.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e de explantes de tomate

O vetor pCambia2300 foi introduzido na cepa de *A. tumefaciens* EHA-105 por eletroporação, de acordo com o protocolo de Brasileiro e Guimarães (2015). Explantes cotiledonares de tomate da variedade Micro-Tom cultivados *in vitro* foram transformados geneticamente via *A. tumefaciens* de acordo com Sun et al. (2006).

3.3 Triagem de plantas transgênicas

As plantas regeneradas foram triadas para a presença do transgene *MdGoIS2* usando PCR. O DNA genômico foi extraído das folhas de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987). A PCR foi realizada usando um kit da *Taq* DNA Polimerase GoTaq® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, e usando um par de primers específico [Gols2tom526F, (TCCGATCTTGTGCTGTGGAC) e Gols2tom925R (CTTGGCAGGTGATGCTGACT)] para gerar um amplicon de 400pb do transgene *MdGoIS2*. Em termociclador, a PCR foi submetida à amplificação nas seguintes condições: 95 °C por dois minutos para desnaturação inicial, seguida de 95 °C por 45s, 56 °C por 30s, 72 °C por 75s durante 35 ciclos, com um ciclo final a 72 °C por cinco minutos para extensão final. Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador (Bio Rad Laboratories) após eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corrido em tampão TBE (Tris – borato – EDTA) 0,5X e corados com SYBR safe.

3.4 Análise de progênie

Sementes da primeira geração (F_1) de plantas autopolinizadas foram germinadas e analisadas quanto à presença de *MdGoIS2* por PCR, conforme descrito anteriormente. Dez linhagens transgênicas (L2, L3, L4, L10, L13, L14, L15, L16, L17 e L18) foram selecionadas e conduzidas para produzir sementes. O teste qui-quadrado de Pearson (X^2) foi usado para determinar se as razões de segregação gênica se encontram com um ajuste adequado com a razão Mendeliana 3:1 (nível de confiança de 95 %).

3.5 Análise quantitativa via RT-PCR em tempo real

Três replicatas biológicas para cada linhagem foram usadas para síntese de cDNA. Os primers para o transgene *MdGoIS2* utilizados foram o GoIS2RTF (TGTCAGCAGGCCAAGAACT) e GoIS2R (TGGCTCCTCCTGAAGTACCA). Os iniciadores para os transcritos do fator de alongamento 1 α (EF-1 α F TACTGGTGGTTTTGAAGCTG; EF-1 α R CTTACGATTTTCATCATA) e LsCACF (ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG) LsCACR (CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG) foram usados como referência interna para normalizar a expressão (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para análises de RT-PCR

Primer	Sequência (5' - 3')	Uso
GoIS2RTF	TGTCAGCAGGCCAAGAAACT	Expressão de <i>MdGoIS2</i>
GoIS2RTR	GGCTCCTCCTGAAGTACCA	
EF α 1 F	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG	Fator de alongamento 1 α
EF α 1 R	AACTTCCTTCACGATTTTCATCATA	
LsCAC F	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	Subunidade média de complexos adaptadores de clatrina/via endocítica
LsCAC R	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	

3.6 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm)

A eficiência fotoquímica do Fotossistema II (PSII) foi determinada pela razão entre a fluorescência variável (Fv) e a fluorescência máxima (Fm), expressa como Fv/Fm, utilizando um medidor de fluorescência de clorofila (modelo OS-30p, Opti-Sciences, EUA). A Fv/Fm foi lida no período da manhã (7–9 horas) dos dias 0, 3, 6, 9 e 12 após o início do estresse, na terceira folha totalmente expandida de plantas submetidas a estresse hídrico, após as folhas terem sido adaptadas à escuridão por 30 minutos utilizando clipes foliares.

3.7 Potencial hídrico das folhas e teor relativo de água (RWC)

O teor relativo de água (RWC) e o potencial hídrico foliar foram determinados utilizando três folhas totalmente expandidas por linhagem, com três repetições biológicas. O peso fresco (FW) foi registrado imediatamente após a coleta das folhas, utilizando uma balança analítica de precisão. As amostras de folhas foram imersas em água destilada e mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, as folhas foram secas com papel toalha e pesadas para obtenção do peso túrgido (TW). A curva de retenção de água foi obtida pela pesagem das folhas submetidas à desidratação em estufa a 35 °C, em 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas. As amostras foram então transferidas para uma estufa a 70 °C e pesadas após 48h, a fim de determinar o peso seco (DW). O teor relativo de água foi calculado por: $RWC (\%) = 100 \times (FW - DW) / (TW - DW)$.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi avaliado nos dias 0, 4, 8 e 12 após o início do estresse hídrico e após a reidratação (dia 16), utilizando uma câmara de pressão do tipo Scholander (modelo SAPS II 3115).

3.8 Ensaio de tolerância à seca e análises fisiológicas

O experimento de déficit hídrico foi realizado em agosto de 2025. Plantas transgênicas da geração F_2 e plantas não transgênicas (WT) foram cultivadas em casa de vegetação em copos descartáveis de 300 mL contendo 200 g de uma mistura composta por Latossolo Vermelho, substrato comercial Bioplant® e vermiculita, na proporção de 1:1:1 (v/v/v). Para garantir a uniformidade experimental, todos os recipientes foram previamente pesados e ajustados para conter exatamente a mesma massa de solo (200 g). A adubação foi realizada após a emergência das plântulas, utilizando fertilizante NPK 10–10–10 na dose de 1 g por kg de mistura de solo.

Durante o período de crescimento vegetativo, as plantas foram mantidas sob irrigação diária, temperatura média de 27 ± 5 °C e iluminação natural, com intensidade luminosa média de $221 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O manejo fitossanitário consistiu em pulverizações foliares com Evidence® (1 g L⁻¹) para o controle da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), Trifmine® (1 g L⁻¹) e Fitoneen® (10 mL L⁻¹) para o controle do oídio (*Oidium* spp.).

O experimento de déficit hídrico foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento. O déficit hídrico foi imposto aos 60 dias após a semeadura por meio da suspensão da irrigação durante 12 dias. Após esse período, as plantas foram re-hidratadas e mantidas sob irrigação diária até o final do experimento. As avaliações fenotípicas foram realizadas 15 dias após a reidratação, e as plantas permaneceram em casa de vegetação até a maturação dos frutos, quando foram realizadas as avaliações de produção.

3.9 Quantificação da produção

A produção foi avaliada com base na massa total de frutos por planta. Foram quantificados frutos de cinco plantas por linhagem transgênica e cinco plantas da linhagem não transgênica (WT), submetidas a estresse hídrico (irrigadas até o 60º dia e, em seguida, mantidas sem irrigação por doze dias). Outras cinco plantas de cada linhagem transgênica e da linhagem WT foram mantidas sob irrigação durante todo o experimento. A colheita foi realizada ao longo de aproximadamente sete

semanas, à medida que os frutos atingiam a maturidade fisiológica, caracterizada por uma coloração vermelha uniforme. Em cada colheita, os frutos foram contados e pesados; os valores acumulados foram utilizados para determinar o número total de frutos e a massa total de frutos por linhagem, com e sem déficit hídrico, ao final do período de avaliação.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quando observadas diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas ao controle por meio do teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Transformação de plantas

O vetor construído mostrou-se eficiente para a transformação genética do tomateiro. A análise por PCR para detecção de *MdGo/S2* identificou a presença do transgene em 10 linhagens independentes, denominadas L2, L3, L4, L10, L13, L14, L15, L16, L17 e L18 (Figura 3). As plantas positivas foram cultivadas em casa de vegetação e deixadas para produzir sementes.

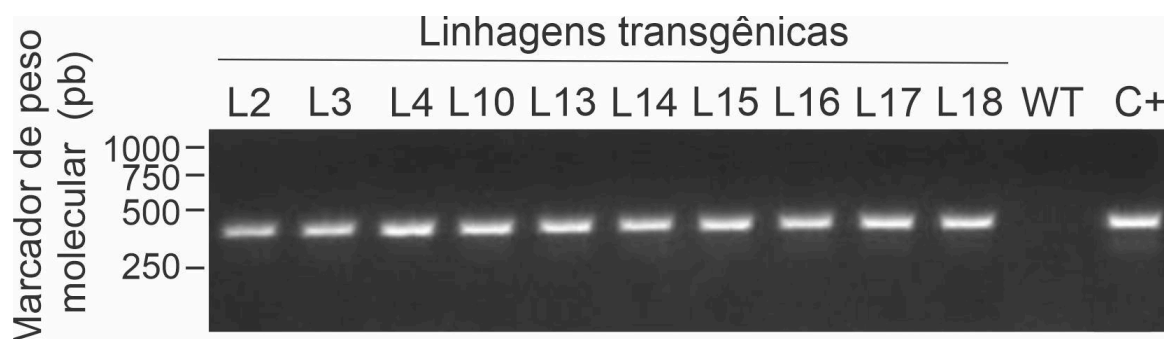


Figura 3: Produtos de amplificação do gene *MdGo/S2* da geração F_0 visualizados em transiluminador. M: Marcador Molecular 1kb. Poços numerados: DNA de plantas transgênicas de *MdGo/S2* F_0 . WT: Controle negativo (DNA de planta WT). C+: Controle positivo contendo DNA plasmidial)

4.2 Análise de progênie

A análise de PCR da geração F_1 confirmou a integração e a transmissão do transgene *MdGo/S2* em cinco linhagens (L2, L4, L10, L14 e L18). As demais linhagens não apresentaram amplificação do transgene na geração F_1 , indicando ausência de transmissão para a progênie.

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi aplicado para avaliar o padrão de segregação do transgene *MdGo/S2* nas progênies F_1 (Tabela 2). As linhagens L10 e L14 apresentaram segregação compatível com a segregação mendeliana esperada de 3:1, enquanto as linhagens L4 e L18 não seguiram o padrão de segregação mendeliano (Tabela 2). A linhagem L2 produziu apenas uma semente na geração F_1 , inviabilizando a aplicação do teste do qui-quadrado. Todas as 5 linhagens que apresentaram transmissão do transgene para F_1 também transmitiram o transgene para F_2 .

Tabela 2 - Análise de segregação do gene *MdGo/S2* em linhagens transgênicas F_1 .

Linhagem	Geração F_1		χ^2	P
	Positivo	Negativo		
4	14	11	4,81	0,028
10	18	4	0,54	0,460
14	11	3	0,09	0,758
18	12	15	13,44	<0,001

Os dados são baseados na análise por PCR para o transgene *MdGo/S2*. *P* é a probabilidade de que as razões observadas reflitam a razão de segregação de 3:1

4.3 Análise via RT-qPCR

A expressão do gene *MdGo/S2* foi avaliada na geração F_2 por RT-qPCR (Figura 4). As linhagens L2 ($P < 0,0001$), e L18 ($P < 0,01$) apresentaram níveis de expressão significativamente superiores em comparação às plantas controle não transgênicas. Entre as linhagens avaliadas, L2 apresentou o maior nível relativo de expressão do transgene, diferindo significativamente das demais linhagens ($P < 0,001$).

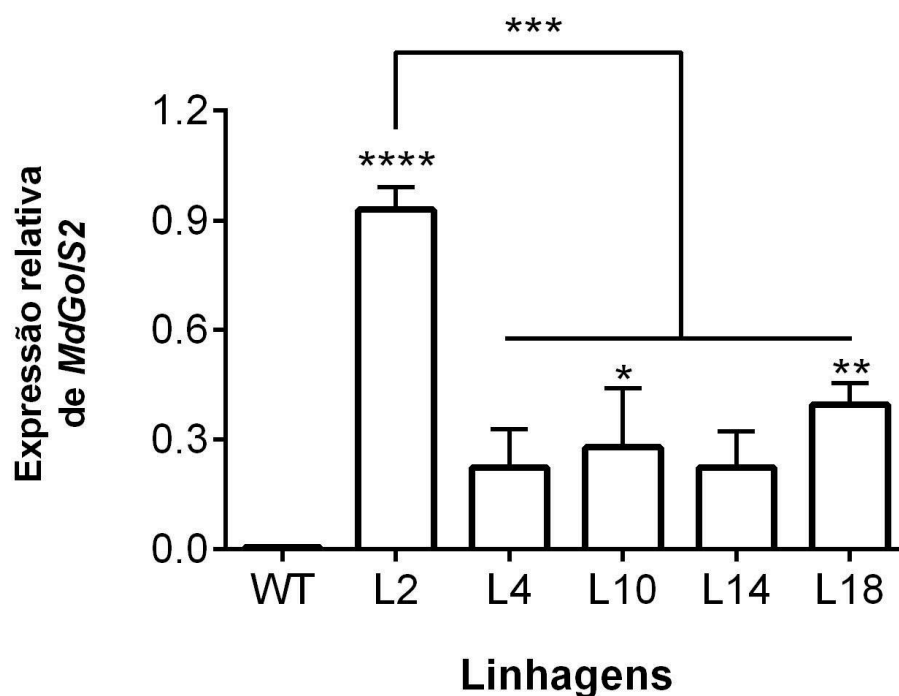


Figura 4: Gráfico com resultados da PCR quantitativa em tempo real para quantificar a expressão do transgene *MdGo/S2* nas folhas de cinco linhagens transgênicas e controle (WT).

4.4 Eficiência fotoquímica

A eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII), estimada pelo parâmetro F_v/F_m , foi avaliada durante o período de déficit hídrico (Figura 5). Os resultados demonstraram que, até o 9º dia, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens avaliadas, indicando manutenção semelhante do desempenho fotossintético sob estresse hídrico. No entanto, no 12º dia, observou-se redução acentuada dos valores de F_v/F_m nas plantas WT e nas linhagens L4, L10, L14 e L18, evidenciando comprometimento do aparato fotossintético sob condições de seca prolongada. Em contrapartida, a linhagem L2 manteve valores significativamente mais elevados de F_v/F_m em comparação à WT e às demais linhagens transgênicas ($P < 0,0001$), demonstrando maior estabilidade fotoquímica e menor dano ao PSII sob estresse hídrico severo. Esses resultados indicam maior tolerância da linhagem L2 ao déficit hídrico.

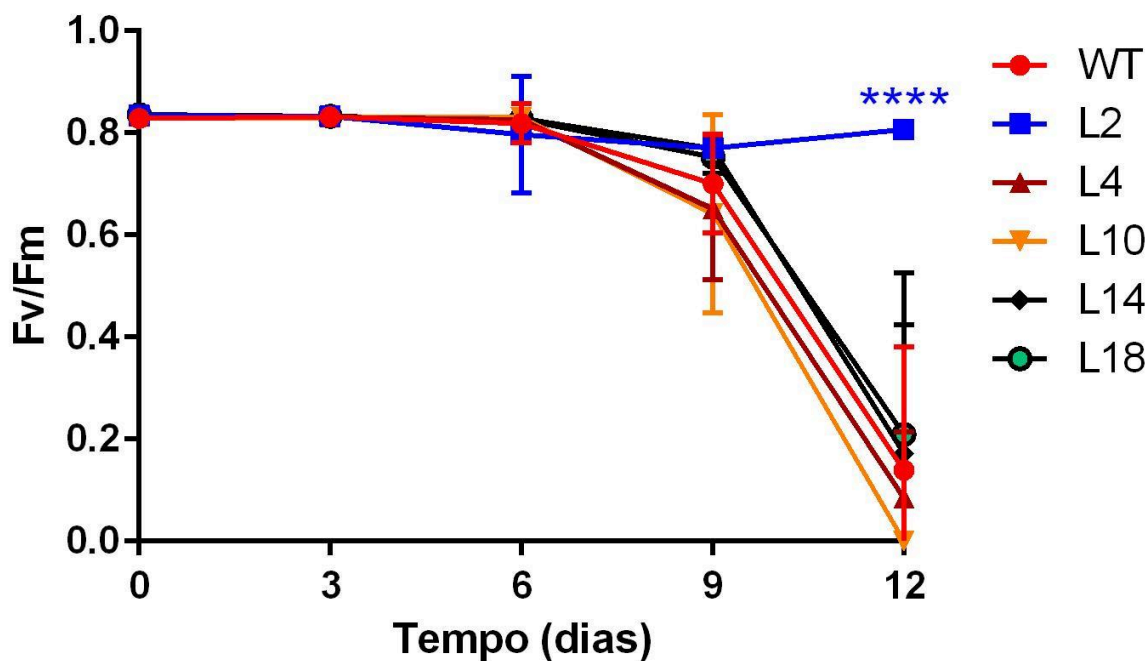


Figura 5: Eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) de linhagens transgênicas e não transgênicas (WT) avaliadas sob condições de déficit hídrico por 12 dias.

4.5 Teor relativo de água foliar e potencial hídrico

O teor relativo de água é amplamente utilizado para monitorar o estado hídrico das folhas sob condições de estresse hídrico. A Figura 6 apresenta dados da perda de água das cinco linhagens e controle ao longo de 72 horas de estresse hídrico. Uma redução progressiva no RWC foi observada em todas as linhagens. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na perda de água entre as linhagens transgênicas e não transgênicas durante o período avaliado.

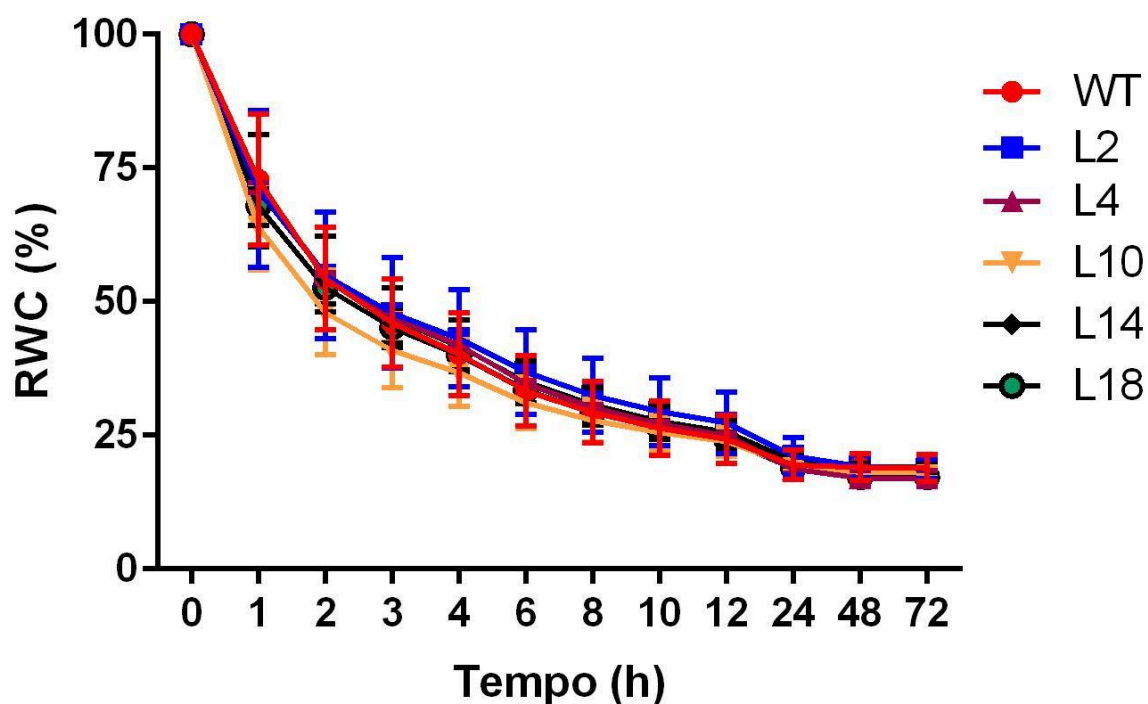


Figura 6. Redução progressiva no conteúdo relativo de água (RWC) ao longo de um período de 72 h.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi monitorado durante todo o período de déficit hídrico. Um declínio progressivo no Ψ_w foi observado em todas as plantas avaliadas à medida que o estresse hídrico se intensificava (Figura 7). No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram detectadas no dia 8 nas linhagens L2 ($P < 0,01$), L4 ($P < 0,001$) e WT ($P < 0,001$). No 12º dia, diferenças significativas foram observadas para as linhagens L2 ($P < 0,001$) e L4 ($P < 0,001$). Após a reidratação (16º dia), a linhagem L2 apresentou diferença de Ψ_w significativa em relação às demais linhagens e à linhagem selvagem (WT) ($P < 0,001$).

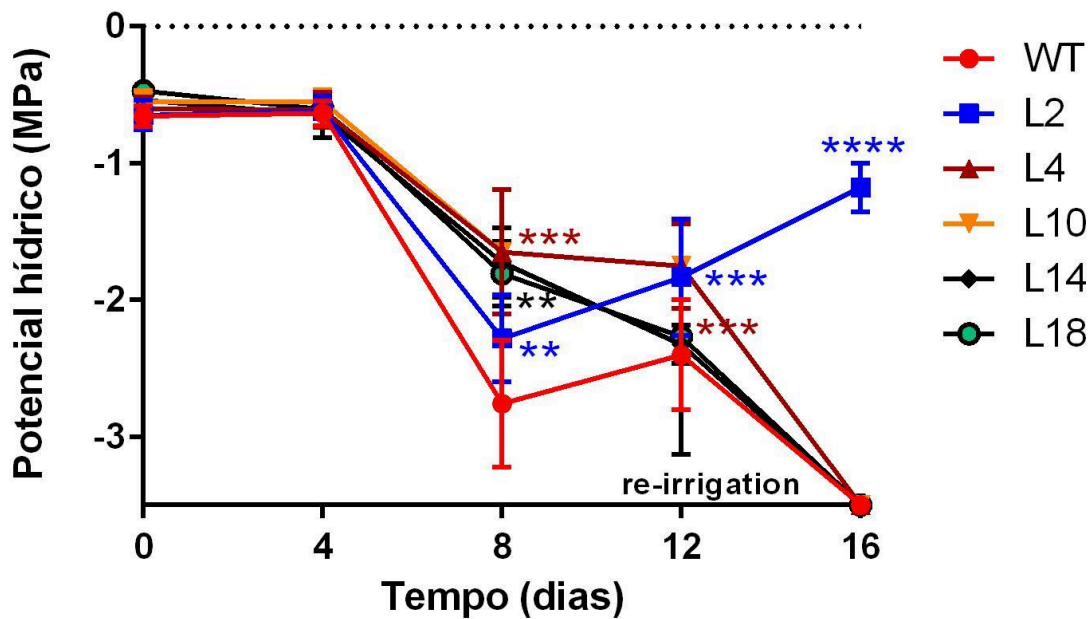


Figura 7: Potencial hídrico foliar (Ψ_w) de linhagens transgênicas (L2, L4, L10, L14 e L18; geração F_2) e não transgênicas (WT) sob déficit hídrico por 12 dias. A reidratação foi realizada no 12º dia e as plantas foram avaliadas novamente quatro dias depois (16º dia). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas observadas nas linhagens transgênicas em comparação com o controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, $n=9$).

Esses resultados indicam que as plantas da linhagem L2 apresentaram melhor desempenho quanto ao potencial hídrico, sendo capazes de se recuperar completamente após a reidratação.

A análise fenotípica realizada 15 dias após a reidratação corroborou os resultados obtidos para o potencial hídrico foliar, demonstrando que as plantas da L2 retomaram o crescimento e deram continuidade ao ciclo de desenvolvimento, enquanto as demais linhagens permaneceram em estado de murcha permanente (Figura 8).

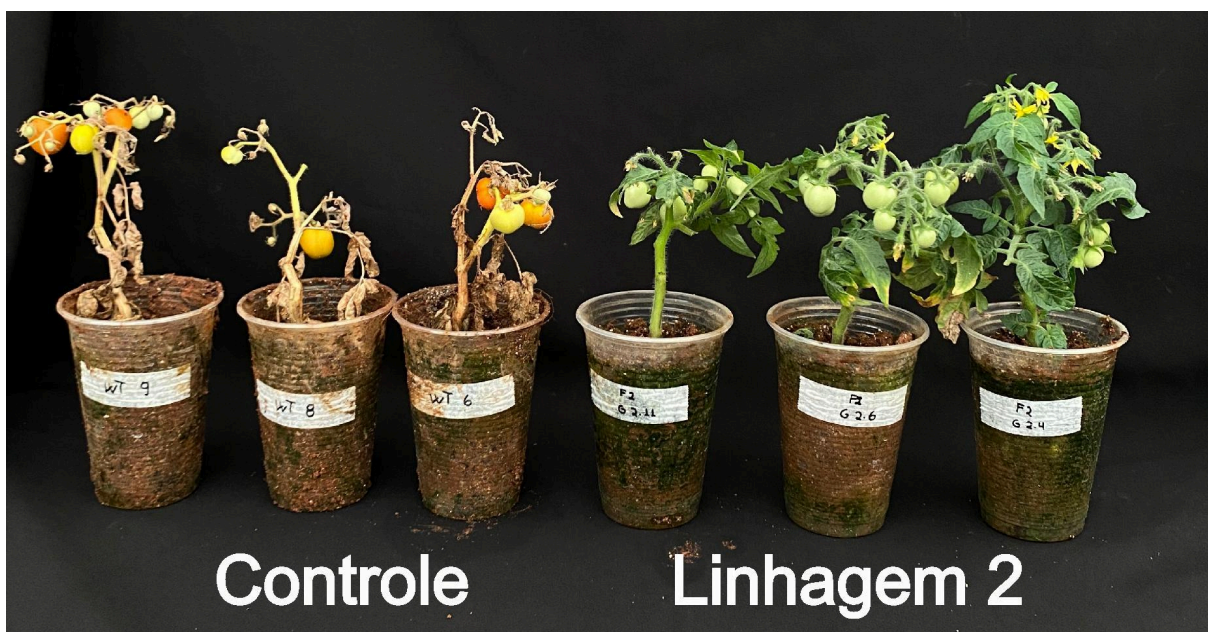


Figura 8. Aspectos fenotípicos das plantas não transgênicas (WT) (esquerda) e da linhagem transgênica estável L2 (geração F₂) (direita) após o ensaio de estresse hídrico. As plantas foram submetidas a 12 dias de deficiência hídrica, seguidos de reidratação. As fotografias foram obtidas 15 dias após o restabelecimento da irrigação, evidenciando a recuperação completa da linhagem L2, enquanto as plantas WT apresentaram murcha permanente.

4.6 Quantificação da produção

A avaliação da produção revelou que, em condições de irrigação plena, não houve diferenças estatisticamente significativas na produção total de frutos por planta entre as linhagens transgênicas e o controle WT ($P = 0,11$) (Figura 9a). Por outro lado, sob déficit hídrico, a linhagem L2 apresentou produção significativamente superior em comparação às demais linhagens transgênicas e ao controle WT ($P < 0,001$) (Figura. 9b). Além disso, a produção da linhagem L2 sob estresse hídrico manteve-se estatisticamente semelhante à observada em condições de irrigação plena, sugerindo maior capacidade de tolerância ao déficit hídrico e manutenção do desempenho produtivo.

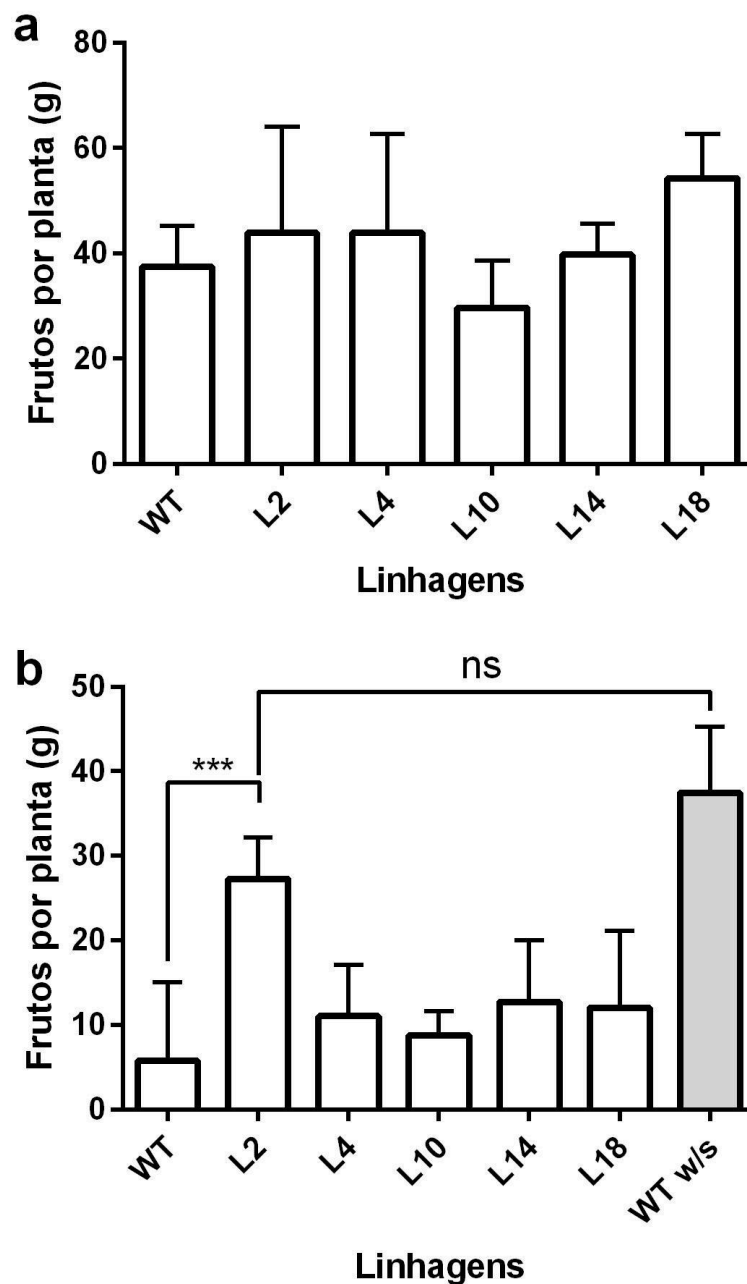


Figura 9: Efeito do estresse hídrico na produção de frutos de plantas não transgênicas (WT) e transgênicas expressando o transgene *MdGoIS2*. Massa total de frutos produzida por planta cultivada sob irrigação normal (a) e em condições de déficit hídrico (b). A barra cinza em b representa a massa total de frutos produzidos em plantas WT cultivadas sem estresse hídrico (irrigação normal; WT w/s) em comparação com plantas da linhagem L2 cultivadas por 12 dias sob condições de estresse hídrico. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos (WT q/s vs. L2 sob estresse). A produção de frutos das plantas L2 foi significativamente maior do que a das plantas não transgênicas sob estresse hídrico (***) $p < 0,001$, $n=5$).

5. DISCUSSÃO

A seca constitui um dos principais desafios enfrentados pela agricultura no contexto das mudanças climáticas, sendo essa situação agravada pela crescente demanda global por alimentos (Rezaei et al., 2023; Farah et al., 2025). Diante disso, o desenvolvimento de culturas tolerantes à seca representa uma estratégia promissora para mitigar os impactos agrônômicos e econômicos associados aos eventos futuros de déficit hídrico. No presente trabalho, foram geradas cinco linhagens transgênicas estáveis de tomate expressando o gene *MdGo/S2* de macieira. O gene *MdGo/S2* codifica uma galactinol sintase funcional (EC 2.4.1.123), uma enzima chave na via biossintética dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) (Elsayed et al., 2014; Jing et al., 2023). Esses carboidratos desempenham papéis importantes na osmorregulação e na resposta ao estresse abiótico, contribuindo para a adaptação da planta por meio do acúmulo de osmólitos e da proteção celular (Sengupta et al., 2015; Wang et al., 2025).

A transformação genética pode resultar em diferentes padrões de herança e expressão do transgene em decorrência da integração aleatória do DNA exógeno no genoma da planta (Jupe et al., 2019; Thomson et al., 2024; Hernández et al., 2025). Assim, diferenças entre eventos independentes são frequentemente observadas e podem estar relacionadas ao número de cópias inseridas, ao local de integração e a possíveis rearranjos do transgene no genoma hospedeiro (Jupe et al., 2019; Thomson et al., 2024). Além disso, transformantes primários podem apresentar mosaicismos somáticos, caracterizado pela presença de diferentes padrões de integração do transgene em células distintas da mesma planta. Esses fenômenos podem comprometer a transmissão uniforme do transgene à descendência e contribuir para desvios dos padrões mendelianos de segregação observados na progênie (Vaucheret et al., 2001; Meyer, 2013; Gelvin, 2021), podendo estar associado à segregação distorcida observada nas linhagens L4 e L18 na geração F₁ (Tabela 2).

A análise quantitativa de RT-qPCR foi realizada para verificar a relação de causa e efeito entre a expressão do gene *MdGo/S2* e a resposta das plantas ao estresse hídrico. Os resultados mostraram que o nível de expressão mais alto do gene *MdGo/S2* foi observado na linhagem L2. Diferenças na expressão do transgene entre eventos independentes são frequentemente observadas em plantas

geneticamente modificadas e geralmente estão associadas às características da inserção do transgene no genoma da planta (Jupe et al., 2019; Thomson et al., 2024). A linhagem L2 apresentou melhor desempenho sob condições de estresse hídrico, sugerindo uma relação de causa e efeito positiva entre a expressão do transgene e a melhoria da tolerância à seca. Esses resultados estão de acordo com pesquisas realizadas em outras espécies, nas quais a superexpressão de genes da família GoIS foi associada ao aumento da tolerância a estresses abióticos, incluindo a seca.

A superexpressão do gene *GoIS2* tem sido amplamente associada ao aumento da tolerância ao déficit hídrico, principalmente devido à intensificação da síntese de galactinol e ao consequente acúmulo de oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs), que atuam como osmoprotetores e estabilizadores de membrana (Nishizawa et al., 2008; Selvaraj et al., 2017; Liu et al., 2022a). A superexpressão de *AtGoIS2* em *Arabidopsis thaliana* levou a maior tolerância à seca (Taji et al., 2002; Bi et al., 2020). Falavigna et al. (2018) observaram maior tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando *MdGoIS2*. Esses compostos contribuem para a manutenção da homeostase celular, redução do estresse oxidativo e preservação da integridade do aparato fotossintético em condições adversas (Nishizawa et al., 2008; ElSayed et al., 2014; Liu et al., 2022b).

Considerando que a resposta da planta ao déficit hídrico depende em grande parte da capacidade do fotossistema II (PSII) de manter sua estabilidade estrutural e eficiência fotoquímica (Kalaji et al., 2016; Selvaraj et al., 2017; Liu et al., 2022b, Jiao e Hu 2025), os resultados observados para a linhagem L2 reforçam o papel funcional do *MdGoIS2* na mitigação dos efeitos do déficit hídrico, especialmente na proteção do PSII e na manutenção da eficiência fotoquímica em condições de seca (Figura 5).

A produção foi outra característica agrônômica complementar que foi medida comparando-se plantas selvagens (WT) e as cinco linhagens transgênicas estáveis em condições de irrigação plena e de seca. Os resultados demonstraram que a linhagem L2 foi capaz de manter a produção (massa total de frutos produzidos por planta, Figura 4) mesmo quando cultivada em condições de seca, sugerindo que as plantas L2 que expressam o gene *MdGoIS2* mantêm a homeostase fisiológica sob estresse hídrico. A homeostase fisiológica, especificamente a regulação da disponibilidade de água (osmorregulação), espécies reativas de oxigênio (ROS) e

hormônios, são os principais determinantes da fertilidade de uma planta sob estresse ambiental (Chaturvedi et al., 2021; Harrap et al., 2020; Ly et al., 2026; Marques 2026; Swain et al., 2023). Embora todos os sistemas se beneficiem da estabilidade homeostática, os tecidos reprodutivos são mais sensíveis a condições estressantes do que os tecidos vegetativos; portanto, manter um equilíbrio homeostático estável é fundamental para prevenir o aborto do pólen e garantir a fertilização bem-sucedida (Chaturvedi et al., 2021; Harrap et al., 2020; Ly et al., 2026; Marques 2026; Swain et al., 2023). Dados os resultados observados, especificamente na linhagem transgênica L2, a expressão de *MdGolS2* provavelmente contribui para a capacidade de osmorregulação e, portanto, ajuda a planta a manter sua homeostase fisiológica e a ter um melhor desempenho em condições de déficit

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 24, n. 1, p. 23–58, 2005. DOI: 10.1080/07352680590910410.
- BHATTACHARYA, S.; KUNDU, A. Sugars and sugar polyols in overcoming environmental stresses. In: ROYCHOUDHURY, A.; TRIPATHI, D. K. (ed.). *Molecular plant abiotic stress: biology and biotechnology*. Hoboken: Wiley, 2020. p. 71–101.
- BI, H.; ZHAO, Y.; LI, H.; LIU, W. Wheat Heat Shock Factor TaHsfA6f increases ABA levels and enhances tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3121, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21093121>
- BOLUORI-MOGHADDAM, M. R.; LE ROY, K.; XIAO, Y.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, v. 277, n. 9, p. 2022–2037, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x>.
- BRASILEIRO, A. C. M.; GUIMARÃES, P. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (eds.). *Manual de transformação genética de plantas*. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 627–648.
- BRENAC, P.; HORBOWICZ, M.; DOWNER, S. M.; DICKERMAN, A. M.; SMITH, M. E.; OBENDORF, R. L. Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize seed development. *Plant Physiology*, v. 113, n. 3, p. 689–695, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.689>.
- CHATURVEDI, P.; WIESE, A. J.; GHATAK, A.; DRÁBKOVÁ, L. Z.; WECKWERTH, W.; HONYIS, D. Heat stress response mechanisms in pollen development. *New Phytologist*, v. 231, n. 2, p. 571–585, 2021. <https://doi.org/10.1111/nph.17380>
- DATLA, R. S.; HAMMERLINDL, J. K.; PELCHER, L. E.; CROSBY, W. L.; SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene*, v. 101, p. 239–246, 1991. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90417-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90417-A)
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15, 1987.
- ECK, M. A.; MURRAY, A. R.; WARD, A. R.; KONRAD, C. E. Influence of growing season temperature and precipitation anomalies on crop yield in the southeastern United States. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 291, p. 108053, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108053>
- EGEA, I.; ESTRADA, Y.; FLORES, F. B.; BOLARÍN, M. C. Improving production and fruit quality of tomato under abiotic stress: genes for the future of tomato breeding for a sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, v. 204, p. 105086, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105086>

ELSAIED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants. *Plant Biology*, v. 16, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1111/plb.12053>

FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; MIOTTO, Y. E.; SANTOS, H. P.; OLIVEIRA, P. R. D.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Evolutionary diversification of galactinol synthases in Rosaceae: adaptive roles of galactinol and raffinose during apple bud dormancy. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, n. 5, p. 1247–1259, 2018. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx451>

FARAH, A. A.; MOHAMED, M. A.; MUSSE, O. S. H.; NOR, B. A. The multifaceted impact of climate change on agricultural productivity: a systematic literature review of SCOPUS-indexed studies (2015–2024). *Discover Sustainability*, v. 6, p. 397, 2025. <https://doi.org/10.1007/s43621-025-01229-2>

FAOSTAT. *Crops and livestock products*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2026. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/>. Acesso em: 28 maio 2026.

GELVIN, S. B. Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA integration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, p. 8458, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22168458>

HARRAP, M. J. M.; IBARRA, N. H.; KNOWLES, H. D.; WHITNEY, H. M.; RANDS, S. A. Floral humidity in flowering plants: a preliminary survey. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00249>

HERNÁNDEZ, S.; ZHONG, V.; BROPHY, J. A. N. SeedSeg: image-based transgenic seed counting for segregation analysis of T-DNA loci. *Plant Methods*, v. 21, n. 1, p. 87, 2025. <https://doi.org/10.1186/s13007-025-01406-4>

JIAO, Q.; HU, X. Recent advances and emerging trends in chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, v. 94, n. 9, p. 2615–2630, 2025. <https://doi.org/10.32604/phyton.2025.069246>

JING, Q.; CHEN, A.; LV, Z.; DONG, Z.; WANG, L.; MENG, X.; FENG, Y.; WAN, Y.; SU, C.; CUI, Y.; XU, W.; HOU, H.; ZHU, X. Systematic analysis of galactinol synthase and raffinose synthase gene families in potato and their expression patterns in development and abiotic stress responses. *Genes*, v. 14, p. 1344, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes14071344>

JUPE, F.; RIVKIN, A. C.; MICHAEL, T. P.; ZANDER, M.; MOTLEY, S. T.; SANDOVAL, J. P.; SLOTKIN, R. K.; CHEN, H.; CASTANON, R.; NERY, J. R.; ECKER, J. R. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions. *PLoS Genetics*, v. 15, n. 1, e1007819, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007819>

KALAJI, H. M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 38, p. 102, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>

KRAKLOW, V. A.; PAFF, K.; COMEAU, D.; SOLANDER, K.; PITTS, T. R.; PRICE, S. F.; XU, C. Impact of drought on global food security by 2050. *Nature Communications*, v. 17, n. 1, p. 1099, 2026. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-67862-7>

KRISHNA, R.; KARKUTE, S. G.; ANSARI, W. A.; JAISWAL, D. K.; VERMA, J. P.; SINGH, M. Transgenic tomatoes for abiotic stress tolerance: status and way ahead. *3 Biotech*, v. 9, n. 4, p. 143, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1665-0>

LI, J.; AI, G.; WANG, Y.; DING, Y.; HU, X.; LIANG, Y.; YAN, Q.; WU, K.; HUANG, R.; CHEN, C.; OUYANG, B.; ZHANG, X.; PAN, Y.; WU, L.; HONG, Z.; ZHANG, J. A truncated B-box zinc finger transcription factor confers drought sensitivity in modern cultivated tomatoes. *Nature Communications*, v. 15, p. 8013, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51699-7>

LI, J.; ZSCHEISCHLER, J.; BEVACQUA, E. Global record-shattering breadbasket droughts emerge from moderately extreme regional events. *Nature Communications*, v. 17, art. 2577, 2026. DOI: 10.1038/s41467-026-70700-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-026-70700-z>.

LIADAKIS, G. N.; TZIA, C. Tomato processing and by-products valorization. In: GALANAKIS, C. M. (ed.). *Tomato processing by-products: bioactive compounds and their applications*. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89889-5.00008-4>

LIU, Y; LIU, H; ZHANG, Qi; CHEN, Jian; ZHANG, Y; WANG, X; MA, F. Raffinose family oligosaccharides: Crucial regulators of plant development and stress responses. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 42, n. 2, p. 286–303, 2022 a. DOI: 10.1080/07388551.2021.1948456.

LIU, Y.; ZHANG, L.; MA, J.; MENG, S.; PANG, C.; ZHAO, X.; ZHANG, H.; WANG, S.; XU, T.; HE, Y.; QI, M. Application of galactinol to tomato enhances tolerance to cold and heat stresses. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, v. 63, p. 311–323, 2022 b. <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00402-6>

LY, Y.; WANG, W.; LIU, H.; WANG, W. Regulation of pollen viability, pollen tube growth and seed development in maize by application of cysteine protease ZmPCP. *Plants*, v. 15, n. 5, p. 677, 2026.

MARQUES, I. The floral bottleneck in a changing climate: molecular mechanisms, knowledge gaps, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 27, n. 7, p. 2926, 2026.

MEYER, P. Transgenes and their contributions to epigenetic research. *International Journal of Developmental Biology*, v. 57, p. 509–515, 2013. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120254pm>

MIYAMOTO, B. C. B.; HACKMANN, C. L. Effects of drought on crop yields and agricultural revenue in Southern Brazil. *Discover Agriculture*, v. 3, p. 246, 2025. <https://doi.org/10.1007/s44279-025-00425-y>

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, v. 147, p. 1251–1263, 2008. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122465>

ORTIZ-BOBEA, A.; AULT, T. R.; CARRILLO, C. M.; CHAMBERS, R. G.; LOBELL, D. B. Anthropogenic climate change has slowed global agricultural productivity growth. *Nature Climate Change*, v. 11, p. 306–312, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01000-1>

PESHEV, D.; VERMEULEN, K.; MOGHADDAM, M. R. B.; VAN DEN ENDE, W. Induction of raffinose oligosaccharides by abiotic stress in plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 170, n. 1, p. 47–55, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.003>.

PETERBAUER, T.; MACH, L.; MUCHA, J.; RICHTER, A. Analysis of the raffinose family oligosaccharide biosynthetic pathway in pea seeds with transgenic plants expressing a soybean raffinose synthase. *Plant Physiology*, v. 129, n. 2, p. 684–695, 2002. DOI: 10.1104/pp.001743.

REZAEI, E. E.; WEBBER, H.; ASSENG, S.; BOOTE, K.; DURAND, J. L.; EWERT, F.; MARTRE, P.; MCCARTHY, D. S. Climate change impacts on crop productivity. *Nature Reviews Earth & Environment*, v. 4, p. 831–846, 2023. <https://doi.org/10.1038/s43017-023-00491-0>

SALNIȚĂ, F.; FARCAȘ, A. C. Tomato processing and health-related bioactive compounds: an updated review. *Foods*, v. 13, n. 2, p. 315, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13020315>

SANYAL, A.; KUMAR, S.; MISHRA, Anil K.; SHARMA, S.; SINGH, R. Raffinose family oligosaccharides (RFOs): role in seed vigor, desiccation tolerance, and stress responses. *Plants*, v. 12, n. 3, art. 657, 2023. DOI: 10.3390/plants12030657.

SELVARAJ, M. G.; ISHIZAKI, T.; VALENCIA, M.; OGAWA, S.; DEDICOVA, B.; MARUYAMA, K.; KUSANO, M.; SAITO, K.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; ISHITANI, M. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increases grain yield in the field. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, p. 1465–1477, 2017. <https://doi.org/10.1111/pbi.12731>

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BASAK, P.; MAJUMDER, A. L. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharides in plant stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 656, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00656>

SUN, H. J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, v. 47, p. 426–431, 2006. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>

SUPRASANNA, P. Plant abiotic stress tolerance: insights into resilience build-up. *Journal of Biosciences*, v. 45, p. 120, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00088-5>

STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, K.; DONCHEVA, S. The role of galactinol and raffinose in plant response to abiotic stress. *General and Applied Plant Physiology*, v. 37, n. 3–4, p. 229–240, 2011.

SWAIN, R.; SAHOO, S.; BEHERA, M.; ROUT, G. R. Instigating prevalent abiotic stress resilience in crop by exogenous application of phytohormones and nutrient. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1104874>

SZABO, K.; VARVARA, R. A.; CIONT, C.; MACRI, A. M.; VODNAR, D. C. An updated overview on the revalorization of bioactive compounds derived from tomato production and processing by-products. *Journal of Cleaner Production*, v. 497, p. 145151, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.145151>

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v. 29, p. 417–426, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x>

THOMSON, G.; DICKINSON, L.; JACOB, Y. Genomic consequences associated with *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Plant Journal*, v. 117, p. 342–363, 2024. <https://doi.org/10.1111/tpj.1649>

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 3083–3091, 2001. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.17.3083>

VICENTE-SERRANO, S. M.; PEÑA-ANGULO, D.; BEGUERÍA, S.; DOMÍNGUEZ-CASTRO, F.; TOMÁS-BURGUERA, M.; NOGUERA, I.; GIMENO-SOTELO, L.; EL KENAWY, A. Global drought trends and future projections. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v. 380, p. 20210285, 2022. <https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0285>

VINSON, C. C.; MOTA, A. P. Z.; PORTO, B. N.; OLIVEIRA, T. N.; SAMPAIO, I.; LACERDA, A. L.; DANCHIN, E. G. J.; GUIMARÃES, P. M.; WILLIAMS, T. C. R.; BRASILEIRO, A. C. M. Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Scientific Reports*, v. 10, p. 15258, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72191-4>

WANG, S.; HE, P.; WANG, Z.; ZHANG, H.; MENG, S.; QI, M. Galactinol synthase 4 influences plant growth and carbohydrate metabolism in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 220, p. 109484, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109484>

ZAHRA, A.; HASSAN, S.; RASHID, B. Deciphering the role of lipid transfer protein (LTP) in transgenic cotton under PEG-induced drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 43, p. 1933–1945, 2025. <https://doi.org/10.1007/s11105-025-01583-5>

Capítulo II

Expressão do gene *MdDHN11* em *Solanum lycopersicum* L. visando aumento da tolerância à seca

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) está entre as hortaliças mais cultivadas e economicamente relevantes do mundo, desempenhando papel importante tanto na alimentação humana quanto na agroindústria (Egea et al., 2022; Wang et al., 2024; Nsele et al., 2026). Pertencente à família Solanaceae, que inclui espécies de importância agrícola, como batata, pimenta e berinjela, o tomate destaca-se por sua ampla versatilidade de uso, podendo ser consumido *in natura* ou processado na forma de molhos, extratos, sopas, ketchup e produtos enlatados (Knapp et al., 2016; Pasin et al., 2024).

Devido à sua sensibilidade à escassez de água, o tomateiro constitui um modelo de grande relevância para estudos voltados à compreensão dos mecanismos de resposta e tolerância à seca. Sob condições de déficit hídrico, ocorrem alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares que comprometem o crescimento vegetativo, a fotossíntese, a qualidade dos frutos e a produção da cultura (Chen et al., 2014; Chowdhury et al., 2023; Wang et al., 2024).

As plantas desenvolveram uma série de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares para minimizar os danos causados pela deficiência de água. Entre esses mecanismos, destaca-se a indução de proteínas associadas à tolerância à desidratação, incluindo as desidrinas (DHNs), um grupo de proteínas pertencentes à família LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) do grupo II (Galau et al., 1986; Banerjee; Roychoudhury, 2016). As desidrinas caracterizam-se por sua elevada hidrofiliabilidade e estrutura intrinsecamente desordenada, propriedades que lhes conferem a capacidade de estabilizar membranas celulares, proteger proteínas contra desnaturação e reduzir os efeitos deletérios da desidratação celular (Garay-Arroyo et al., 2000; Liu et al., 2017). Em razão dessas características, essas proteínas são consideradas componentes importantes dos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico, contribuindo para a manutenção da integridade celular e da funcionalidade metabólica em condições adversas.

Diversos estudos têm demonstrado que a superexpressão de genes codificadores de desidrinas pode aumentar significativamente a tolerância ao estresse hídrico em diferentes espécies vegetais, evidenciando seu potencial para aplicação em programas de melhoramento genético e engenharia genética de plantas (Riyazuddin et al., 2022). Em maçã (*Malus domestica* Borkh.), o gene

MdDHN11 apresenta elevada expressão em tecidos submetidos ao déficit hídrico, estando associado à proteção celular durante processos de desidratação (Falavigna et al., 2019). Além disso, plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando *MdDHN11* apresentaram maior sobrevivência e melhor desempenho fisiológico sob condições de estresse hídrico severo, demonstrando o papel funcional desse gene na promoção da tolerância à seca (Falavigna et al., 2019).

Considerando o potencial das desidrinas na proteção celular durante períodos de restrição hídrica e a importância do tomateiro como cultura agrícola de relevância mundial, a expressão heteróloga do gene *MdDHN11* em tomate representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo gerar e caracterizar plantas transgênicas de tomate expressando o gene *MdDHN11*, avaliando sua transmissão genética e seu potencial para aplicação em programas de melhoramento voltados à tolerância à seca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver plantas transgênicas de tomate para superexpressar o gene *MdDHN11* visando aumentar a tolerância ao déficit hídrico.

2.2 Objetivos Específicos

- Transformar geneticamente plantas de tomate para superexpressar o gene *MdDHN11*;
- Realizar a caracterização molecular e biológica de linhagens geneticamente modificadas;
- Analisar a segregação dos genes exógenos nas linhagens das plantas transgênicas;
- Desafiar as linhagens transgênicas de tomate *MdDHN11* em ensaios de estresse hídrico;
- Realizar análises fisiológicas das linhagens de transgênicas de tomate *MdDHN11* durante o período de déficit hídrico;
- Avaliar a produção de linhagens transgênicas sob déficit hídrico;
- Comparar a produção de linhagens transgênicas sob condições de irrigação plena com o controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades deste trabalho foram executadas no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada à Agricultura Tropical (LEG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.1 Construção de vetores para transformação de tomate

O vetor plasmidial usado para expressar o gene *MdDHN11* (acesso GenBank KF578381) em tomate foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science (www.epochlifescience.com). Os cassetes para expressão foram clonados no vetor pCAMBIA2300 contendo o gene *nptII*, que codifica para a enzima Neomicina Fosfotransferase tipo II (NPTII) e confere resistência à canamicina, utilizada para selecionar as células transformadas sob controle do promotor 35S (CaMV). Os detalhes estão na figura 10.

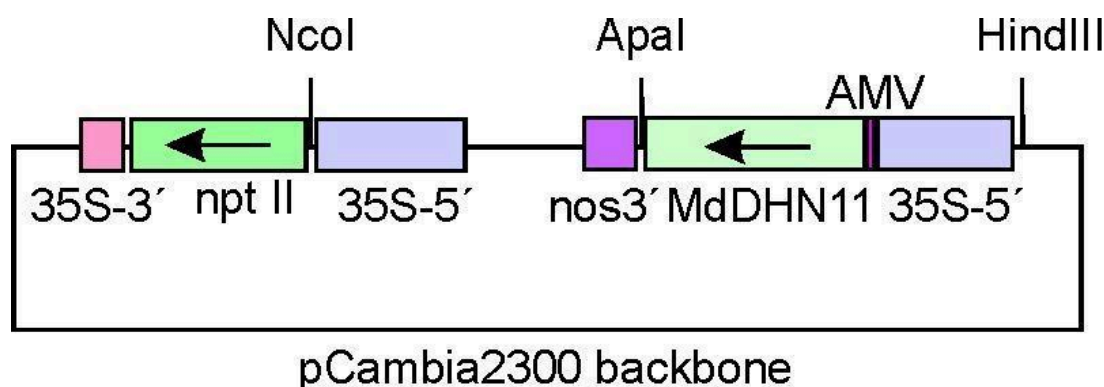


Figura 10. Representação esquemática do vetor binário GS71412-1 DHN11, com o cassete de expressão do gene *MdDHN11*: promotor 35SCaMV, com enhancer AMV, terminador nos3', e gene marcador de seleção *nptII*, dirigido pelo promotor 35SCaMV, terminador 35SCaMV. O backbone do plasmídeo é o PCAMBIA2300.

3.2 Transformação genética da *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor GS71412-1DHN11 foi usado para transformar *A. tumefaciens* EHA-105 por eletroporação, de acordo com o protocolo de Brasileiro e Guimarães (2015). Uma alíquota de 2 µL do vetor (concentração de 10 ng de DNA) foi adicionada a 40µL de suspensão de células de *A. tumefaciens*. Em seguida o volume total da suspensão foi transferido para uma cubeta de eletroporação no qual foi aplicado um pulso elétrico de 1,8 kV no eletroporador (MicroPulser, BioRad).

Após a eletroporação, foram adicionados à cubeta 400 µL de meio LB líquido, e em seguida a suspensão foi transferida para um microtubo e incubada em estufa por duas horas a 28°C.

Alíquotas de 100 µL de cada transformação foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo os agentes seletivos: canamicina (100 mg/L) e rifampicina (100 mg/L) e foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Dois clones isolados foram multiplicados em meio LB líquido acrescidos com os antibióticos seletivos por 48 horas a 28 °C e 180 rpm. Foram preparadas alíquotas com acréscimo de 25% de glicerol autoclavado e armazenadas em freezer -80 °C.

3.3 Transformação genética de tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens*

Explantos cotiledonares de tomate da variedade Micro-Tom cultivados *in vitro* foram transformados geneticamente via *A. tumefaciens* de acordo com Sun et al., (2006) com modificações. As sementes de tomate passaram por um processo de desinfestação, foram submersas por 1 minuto em etanol 70% (v/v), e em seguida transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por cinco minutos. As sementes foram lavadas 5 vezes em água destilada autoclavada, e foram secas em papel filtro autoclavado. Depois, as sementes foram transferidas para frascos contendo 40 mL de meio de germinação, sendo sais de MS com vitaminas 0,5X, sacarose 1,5%, ágar 0,6% e pH 5,7. Os frascos foram mantidos no escuro em câmara de cultura a 25 ± 2 °C, por seis dias e depois transferidos para luz sob fotoperíodo de 16 horas.

As agrobactérias contendo o vetor GS71412-1DHN11 foram plaqueadas em meio AB sólido contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L), e incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a cultura bacteriana do meio AB sólido, foi coletada e ressuspensa em meio de cocultura líquida (MS sais, vitamina B5, sacarose 3%, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, BAP 1,1 mg/L, AIA 0,1 µM, acetoseringona 200 µM, cisteína 400 mg/L e pH 5,2). A suspensão bacteriana foi homogeneizada em agitador vortex e a densidade ótica ajustada para 0,5 a A_{600} nm em equipamento espectrofotômetro (Eppendorf biophotometer plus, DE).

Os cotilédones provenientes de plântulas de 'Micro-Tom' germinadas *in vitro*, foram cortados ao meio de forma transversal, e nas extremidades distais e proximais, e depositados em uma placa de Petri na suspensão bacteriana por 30

minutos. Em seguida, os explantes foram secos, em papel filtro autoclavado e postos em meio de cocultura sólido, sendo: MS sais 1X, vitaminas B5 1X, sacarose 3%, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, BAP 1,1 mg/L, AIA 0,1 µM, acetoseringona 200 µM, cisteína 400 mg/L, , ágar 0,6% e pH 5,2. Os explantes cotiledonares foram inoculados no meio de cocultura sólido com a superfície abaxial em contato com o meio, onde permaneceram durante 48 horas no escuro a 20 °C.

Após o período de incubação da cocultura sólida, os explantes foram transferidos para placas com meio de indução de gemas, sendo composto por MS Sais 1X, vitamina B5 1X, sacarose 2% (m/v), PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, nitrato de prata 2 mg/L, zeatina 5 µM, AIA 0,1 µM, ágar 0,6% e pH 5,7; com adição de Timentin® 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L (m/v) e canamicina 100 mg/L como agente seletivo. As placas com os explantes foram mantidas em câmara de cultura com fotoperíodo de 16 horas. A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para novo meio de indução até a diferenciação de gemas. Brotos regenerados de gemas foram transferidos para frascos com meio de alongamento, sendo MS sais 1X, vitaminas B5 1X, sacarose 3% (m/v), ágar 0,6% (m/v) e pH 5,7; com adição de Timentin® 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L e canamicina 25 mg/L. Após a elongação dos brotos e o desenvolvimento das raízes, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação.

3.4 Extração de DNA genômico e PCR

O DNA das plantas regeneradas e das progênes foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Amostras foliares foram maceradas em tubos de centrifuga de 1,5 mL, tipo Eppendorf, na presença do tampão CTAB 2% (m/v) (brometo de cetrimônio) e incubados a 64 °C por 20 minutos. Para desnaturação e solubilização das proteínas foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, e os microtubos contendo a mistura foram homogeneizados em agitador do tipo Vortex™ e centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado em isopropanol gelado, sendo homogeneizado cuidadosamente por inversão do tubo, e logo após, centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado em etanol 70%, que foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e após secagem o sedimento foi ressuspensionado em água milli-Q autoclavada.

O DNA extraído foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima *Taq* DNA Polimerase GoTaq® (Promega), conforme recomendação do fabricante. Para detecção do transgene *MdDHN11* em tomate foram utilizados os primers DHN11tom104F e DHN11tom335R, as sequências dos primers estão na tabela 3. Em termociclador, a reação de PCR foi submetida à amplificação nas seguintes condições: 95 °C por dois minutos para desnaturação inicial, seguida de 95 °C por 45s, 56 °C por 30s, 72 °C por 30s durante 35 ciclos, com um ciclo final a 72 °C por cinco minutos para extensão. Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador (Bio Rad Laboratories) após eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corrido em tampão TBE (Tris – borato - EDTA) 0,5X e corados com SYBR safe.

Tabela 3 - Primers utilizados para a detecção da sequência de DNA do transgenes *MdDHN11*

Primer	Sequência (5' - 3')	Uso
DHN11tom104F	TCGTGACCATGACCTTGTGT	Detecção do transgene <i>MdDHN11</i> em tomate (263 pb)
DHN11tom335R	CTGGTTACGGAGTGGGAGTG	

3.5 Análise de progênie

Sete linhagens transgênicas (DHN11-1; DHN11-2; DHN11-3; DHN11-8; DHN11-9; DHN11-13; e DHN11-14) foram selecionadas e cultivadas em casa de vegetação para a produção de sementes da primeira geração (F_1). As sementes foram germinadas em uma mistura de latossolo vermelho, substrato bioplant e vermiculita na proporção 1:1:1. As plantas da geração F_1 foram analisadas quanto a presença do Transgene *MdDHN11* por PCR. O teste qui-quadrado de Pearson (X^2) foi usado para determinar se as razões de segregação gênica como base na razão Mendeliana 3:1 com nível de confiança de 95%.

3.6 Análise quantitativa de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

O ensaio de RT-qPCR foi realizado conforme descrito por Andrade et al., (2016). Três repetições biológicas para cada linhagem foram utilizadas para a síntese do cDNA. Os primers para detecção do transgene *MdDHN11* foram

desenhados usando a ferramenta PrimerQuest (IDT Integrated DNA Technologies, Inc). Os transcritos do fator de alongamento 1 α (EF-1 α) e da subunidade média de complexos adaptadores de clatrina/via endocítica (CAC) foram usados como referência interna para normalizar a expressão gênica. Na tabela 4 estão descritos as sequências dos primers utilizados.

Tabela 4. Primers utilizados para análises de RT-PCR

Primer	Sequência (5' - 3')	Uso
DHN11RTF	TGGTGACCAGGAAGTTTGTCC	Expressão de MdDHN11
DHN11RTF	TGGCTCAAATCAGGGACGAA	
EF α 1 F	TACTGGTGGTTTTGAAGCTG	Fator de alongamento 1 α
EF α 1 R	AACTTCCTTCACGATTTTCATCATA	
LsCAC F	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG	Subunidade média de complexos adaptadores de clatrina/via endocítica
LsCAC R	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	

3.7 Ensaio de tolerância à seca e análises fisiológicas

A avaliação da resposta das plantas ao déficit hídrico foi conduzida em casa de vegetação utilizando plantas transgênicas da geração T2 e plantas não transgênicas (WT). As mudas foram cultivadas em recipientes plásticos descartáveis com capacidade de 300 mL, contendo exatamente 200 g de uma mistura composta por Latossolo Vermelho, substrato comercial Bioplant® e vermiculita, na proporção de 1:1:1 (v/v/v). Para garantir a padronização das condições experimentais, todos os recipientes foram previamente pesados e ajustados para conter a mesma massa de substrato. Após a emergência das plântulas, realizou-se a adubação com fertilizante NPK 10–10–10 na dose de 1 g por quilograma da mistura de substrato.

Durante a fase de crescimento vegetativo, as plantas foram mantidas sob irrigação diária, temperatura média de 27 ± 5 °C e iluminação natural, com intensidade luminosa média de $221 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O manejo fitossanitário consistiu em aplicações foliares preventivas de Fitoneen® (10 mL L⁻¹), realizadas em

intervalos de 15 dias, visando à prevenção da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e do oídio (*Oidium* spp.).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. O déficit hídrico foi imposto aos 50 dias após a semeadura por meio da suspensão da irrigação durante dez dias consecutivos. Durante o período de déficit hídrico, foram realizadas avaliações fisiológicas das plantas. Após esse período, a irrigação diária foi retomada, e a tolerância das linhagens ao déficit hídrico foi avaliada por meio de avaliações fenotípicas visuais relacionadas à capacidade de recuperação das plantas após a reidratação, considerando características como a retomada do turgor foliar, a recuperação do crescimento vegetativo e a sobrevivência das plantas. As plantas permaneceram em casa de vegetação sob irrigação regular até a maturação dos frutos, possibilitando a avaliação dos efeitos do déficit hídrico sobre a produção das diferentes linhagens. O ensaio de tolerância à seca foi realizado em dezembro de 2025.

3.8 Eficiência fotoquímica (Fv/Fm)

A integridade funcional do Fotossistema II (PSII) foi avaliada por meio da eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), obtida a partir da razão entre a fluorescência variável (Fv) e a fluorescência máxima (Fm). As medições foram realizadas utilizando um fluorômetro portátil de clorofila (OS-30p, Opti-Sciences, EUA) na terceira folha completamente expandida das plantas submetidas ao déficit hídrico.

As avaliações foram efetuadas no período da manhã, entre 7h e 9h, nos dias 0, 3, 6 e 9 após a suspensão da irrigação. Antes das leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando cliques foliares, garantindo a determinação da eficiência fotoquímica máxima do PSII.

3.9 Potencial hídrico das folhas

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado nos dias 0, 3, 6 e 9 após o início do déficit hídrico utilizando uma câmara de pressão tipo Scholander (modelo SAPS II 3115, Soilmoisture Equipment Corp., EUA). As avaliações foram realizadas em três plantas por tratamento, correspondendo a três repetições biológicas. Em cada planta, foram analisadas três folhas totalmente expandidas, totalizando nove observações por tratamento em cada período de avaliação.

3.10 Quantificação da produção

A produção foi avaliada com base no número total de frutos e na massa total de frutos produzidos por planta. Para essa análise, foram utilizadas cinco plantas de cada linhagem transgênica e cinco plantas da linhagem não transgênica (WT) submetidas ao déficit hídrico. Adicionalmente, foram avaliadas cinco plantas de cada linhagem transgênica e da linhagem WT mantidas sob irrigação contínua durante todo o experimento.

Após o período de déficit hídrico e a retomada da irrigação, todas as plantas permaneceram em casa de vegetação até a maturação dos frutos. Os frutos foram colhidos à medida que atingiam a maturação fisiológica, caracterizada pela coloração vermelha uniforme. Em cada colheita, todos os frutos produzidos por cada planta foram contabilizados e pesados. Os dados acumulados ao longo do período experimental foram utilizados para determinar o número total de frutos e a massa total de frutos produzidos por planta em cada tratamento.

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quando observadas diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas ao controle por meio do teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Transformação genética de tomate

O vetor construído mostrou-se eficiente para a transformação genética de tomateiro, resultando na obtenção de sete eventos independentes da cultivar Micro-Tom contendo o transgene *MdDHN11* na geração F₀ (Figura 11). As linhagens foram denominadas DHN11-1, DHN11-2, DHN11-3, DHN11-8, DHN11-9, DHN11-13 e DHN11-14.



Figura 11: Detecção do transgene *MdDHN11* em plantas da geração F₀ por PCR. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV após eletroforese em gel. M: marcador de peso molecular de 1kb; poços numerados: eventos transgênicos F₀; C-: DNA de planta WT utilizado como controle negativo; C+: DNA plasmidial contendo o gene *MdDHN11*, utilizado como controle positivo.

4.2 Análise de progênie

A análise de PCR da geração F₁ confirmou a integração e a transmissão do transgene *MdDHN11* em seis linhagens denominadas: DHN11-1; DHN11-2; DHN11-3; DHN11-9; DHN11-13; e DHN11-14. Uma das linhagens não apresentou amplificação do transgene na geração F₁ (DHN11-8), indicando ausência de transmissão detectável para a progênie avaliada.

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar o padrão de segregação do transgene *MdDHN11* nas progênes F₁ (Tabela 5). Os resultados demonstraram que as linhagens DHN11-1, DHN11-3, DHN11-9, DHN11-13 e DHN11-14 apresentaram segregação compatível com a proporção mendeliana esperada de 3:1. A linhagem DHN11-2 apresentou segregação compatível com a proporção de 15:1, indicando a presença de duas inserções independentes do transgene.

Tabela 5 - Análise de segregação do gene *MdDHN11* em linhagens transgênicas F₁.

Linhagem	Geração F ₁		Probabilidade 3:1 ou 15:1	X ²	P ^a
	Positivo	Negativo			
1	21	4	3:1	1,08	0,299
2	23	2	3:1	5,88	0,015
			15:1	0,13	0,711
3	15	5	3:1	0	1,000
9	3	2	3:1	0,6	0,439
13	13	6	3:1	0,43	0,508
14	14	8	3:1	1,51	0,218

Dados gerados por análise de PCR analysis para o transgene DHN11. P^a é a probabilidade de observar a segregação 3:1. ou 15:1

4.3 Análise de RT-qPCR

A expressão relativa de *MdDHN11* foi avaliada por RT-qPCR em plantas da geração F₂ (Figura 12). As linhagens DHN11-1, DHN11-2, DHN11-3, DHN11-13 e DHN11-14 apresentaram expressão estatisticamente significativa de *MdDHN11*. A maior expressão foi observada na linhagem DHN11-13 ($P < 0,0001$), seguida pela linhagem DHN11-14 ($P < 0,01$). As linhagens DHN11-1, DHN11-2 e DHN11-3 também apresentaram expressão significativa do transgene ($P < 0,05$). A linhagem DHN11-9 não diferiu significativamente das plantas não transgênicas (WT) quanto à expressão de *MdDHN11*.

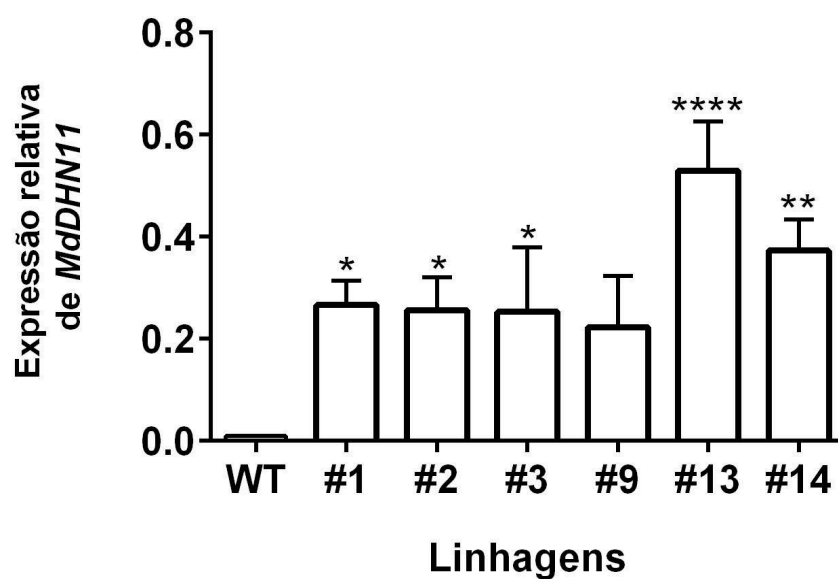


Figura 12. PCR quantitativa em tempo real para quantificar a expressão do transgene *MdDHN11* nas folhas de cinco linhagens transgênica e controle (WT).

4.4 Eficiência fotoquímica

A razão F_v/F_m foi avaliada durante o período de déficit hídrico (Figura 13). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens transgênicas e as plantas não transgênicas (WT) ao longo dos nove dias de estresse hídrico. Ao final desse período, observou-se redução dos valores de F_v/F_m em todas as linhagens avaliadas, entretanto, essa redução ocorreu de forma semelhante entre os genótipos, não sendo detectadas diferenças significativas entre as linhagens transgênicas e a WT.

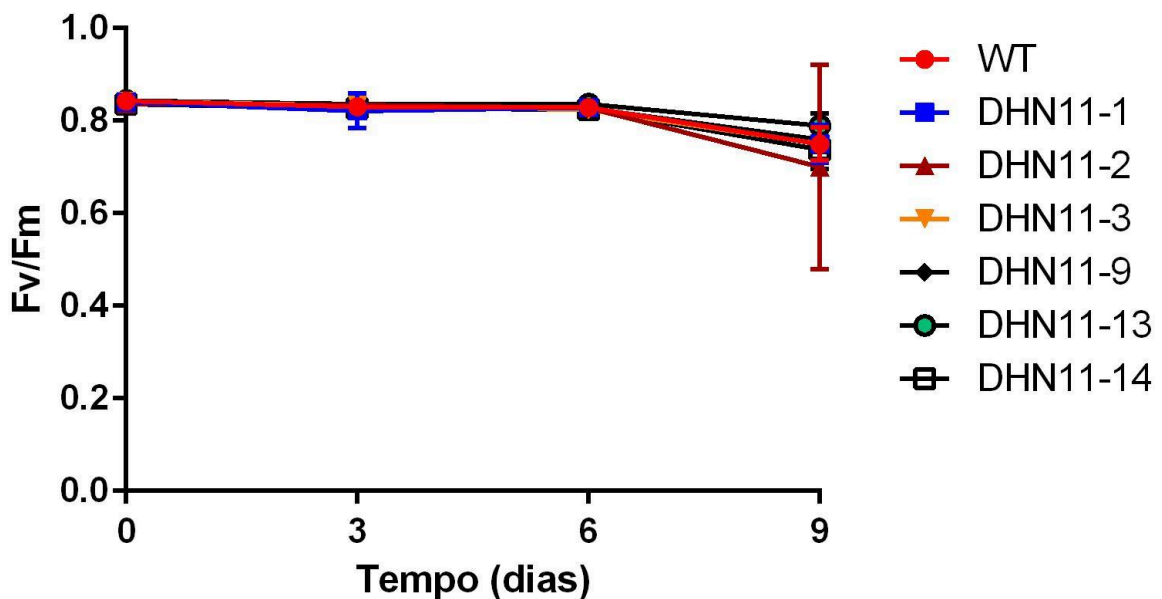


Figura 13: Eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) de linhagens transgênicas e não transgênicas (WT) avaliadas sob condições de déficit hídrico de 9 dias.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi monitorado durante o período de déficit hídrico (Figura 14). Observou-se redução progressiva dos valores de Ψ_w em todas as linhagens à medida que o estresse hídrico se intensificava. Até o 3º dia após a suspensão da irrigação, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens. No entanto, aos 6 e 9 dias de déficit hídrico, as linhagens DHN11-13 ($P < 0,0001$) e DHN11-14 ($P < 0,0001$) apresentaram valores de Ψ_w significativamente menos negativos que os observados nas plantas não transgênicas (WT). Esses resultados indicam maior capacidade dessas linhagens em manter o estado hídrico foliar sob condições de déficit hídrico.

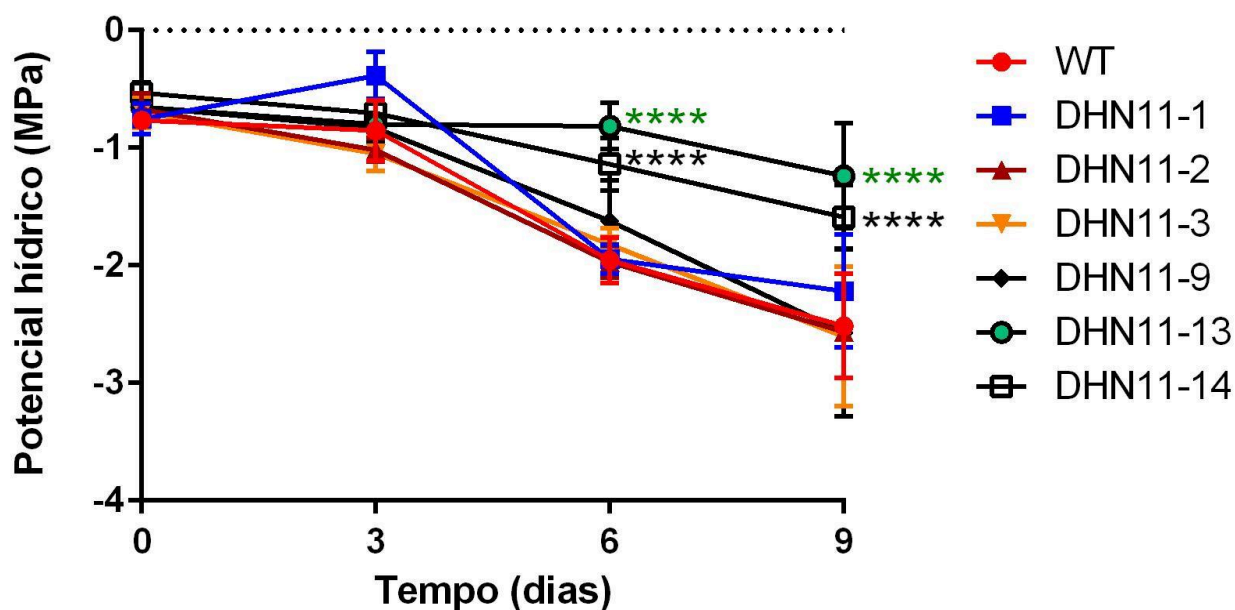


Figura 14: Potencial hídrico foliar (Ψ_w) de linhagens transgênicas (DHN11-1, DHN11-2, DHN11-3, DHN11-9, DHN11-13 e DHN11-14; geração F_2) e não transgênicas (WT) sob déficit hídrico por 9 dias. A reidratação foi realizada no 9º dia e as plantas foram avaliadas novamente quatro dias depois (13º dia). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas observadas nas linhagens transgênicas em comparação com o controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, $n=9$).

Corroborando os resultados obtidos para o potencial hídrico foliar, a avaliação fenotípica das plantas submetidas ao déficit hídrico demonstrou diferenças na capacidade de recuperação entre as linhagens avaliadas. Após a reidratação, a linhagem DHN11-13 apresentou a melhor recuperação, retomando o crescimento vegetativo. A linhagem DHN11-14 apresentou recuperação de algumas das plantas, enquanto as demais linhagens transgênicas e as plantas não transgênicas (WT) permaneceram com sintomas severos de murcha (Figura 15).



Figura 15. Aspecto fenotípico das plantas WT não transgênicas (esquerda) e da linhagem transgênica estável DHN11-13 (direita, geração F₂) após o ensaio de déficit hídrico. As plantas foram mantidas sob déficit hídrico por 10 dias, reidratadas e fotografadas quatro dias após a reidratação.

4.5 Quantificação da produção

A produção das plantas submetidas ao déficit hídrico foi avaliada por meio da massa total de frutos por planta (Figura 16a) e do número total de frutos por planta (Figura 16b). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens transgênicas e as plantas não transgênicas (WT) para nenhuma das variáveis analisadas.

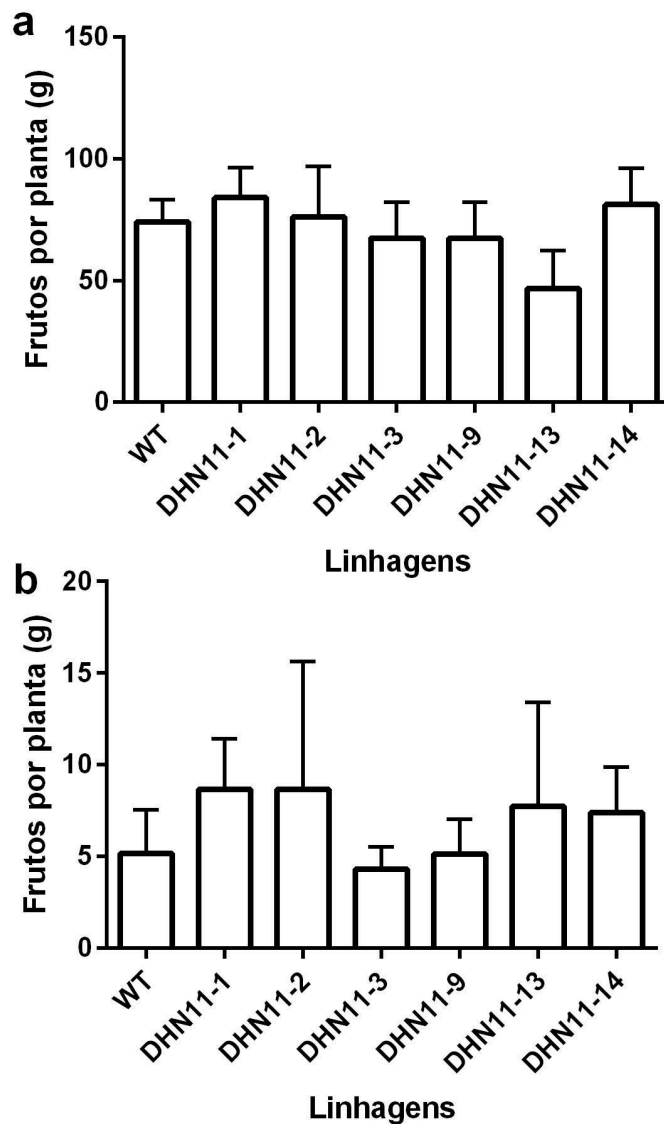


Figura 16: Efeito do estresse hídrico na produção de frutos de plantas não transgênicas (WT) e transgênicas expressando o transgene *DHN11*. Massa total de frutos produzidos por planta cultivada sob irrigação normal (a) e em condições de déficit hídrico (b).

5. DISCUSSÃO

A seca é um dos principais desafios enfrentados pela agricultura na atualidade. Nesse contexto, o desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico constitui uma importante estratégia de adaptação e mitigação, contribuindo para a manutenção da produção de alimentos diante dos impactos das mudanças climáticas (Ngongolo e Mmbando, 2024; Palmgren e Shabala, 2024).

No presente estudo, a transformação genética de tomateiro com o gene *MdoDHN11* resultou na obtenção de linhagens transgênicas capazes de transmitir o transgene à descendência. A análise de segregação das progêneses F_1 demonstrou que as linhagens 1, 3, 9, 13 e 14 apresentaram razões compatíveis com a segregação mendeliana esperada de 3:1 para um único locus de inserção do transgene.

Esses resultados sugerem a integração estável de *MdoDHN11* e sua transmissão à descendência de acordo com os padrões mendelianos clássicos. Por outro lado, a linhagem 2 apresentou segregação incompatível com a razão 3:1, mas compatível com a razão 15:1. Esse padrão pode ser explicado pela presença de dois locos independentes de inserção do transgene segregando simultaneamente na progênie. Padrões de segregação distintos entre eventos independentes são frequentemente observados em plantas geneticamente modificadas e refletem a natureza aleatória da integração do DNA exógeno no genoma vegetal, podendo estar associados ao número de cópias inseridas e aos sítios de integração do transgene (Jupe et al., 2019; Thomson et al., 2024).

A análise de segregação das progêneses F_1 demonstrou que as linhagens 1, 3, 9, 13 e 14 apresentaram razões compatíveis com a segregação mendeliana esperada de 3:1 para um único *loci* de inserção do transgene. Esses resultados sugerem a integração estável do transgene *MdoDHN11* e sua transmissão à descendência de acordo com os padrões mendelianos clássicos. Por outro lado, a linhagem 2 apresentou segregação incompatível com a razão 3:1, mas compatível com a razão 15:1. Esse padrão pode ser explicado pela presença de dois locos independentes de inserção do transgene segregando simultaneamente na progênie. Padrões de segregação distintos entre eventos independentes são frequentemente observados em plantas geneticamente modificadas e refletem a natureza aleatória da integração do DNA exógeno no genoma vegetal, podendo estar associados ao

número de cópias inseridas e aos sítios de integração do transgene (Jupe et al., 2019; Thomson et al., 2024).

A expressão do gene *MdDHN11* em tomateiro da variedade Micro-Tom contribuiu para aumentar a tolerância das plantas ao déficit hídrico. As linhagens DHN11-13 e DHN11-14 apresentaram os maiores níveis de expressão do transgene *MdDHN11* e também o melhor desempenho sob condições de restrição hídrica, sugerindo uma associação positiva entre a expressão desse gene e a tolerância à seca. Resultados semelhantes foram relatados por Falavigna et al. (2019), que demonstraram que a expressão de *MdoDHN11* em *Arabidopsis thaliana* aumentou a sobrevivência das plantas submetidas ao déficit hídrico.

A expressão de genes codificadores de desidrinas em diferentes espécies vegetais tem sido associada ao aumento da tolerância à seca. Em tomateiro, Muñoz-Mayor et al. (2012) observaram que plantas expressando a desidrina *tas14* apresentaram maior ajuste osmótico e melhor desempenho sob seca, enquanto Guo et al. (2019) observaram que a expressão de *SiDHN* promoveu maior proteção celular, preservação dos cloroplastos e aumento da capacidade antioxidante. Estudos mais recentes com *GmDHN9* (Fan et al., 2024) e *BdDHN3* (Martínez et al., 2025) também demonstraram que níveis elevados de expressão de desidrinas estão associados à maior retenção de água, redução dos danos celulares e aumento da tolerância ao déficit hídrico.

As linhagens DHN11-13 e DHN11-14 apresentaram valores de Ψ_w significativamente menos negativos durante o déficit hídrico, evidenciando maior capacidade de conservar o estado hídrico foliar em relação à WT. Como a manutenção do potencial hídrico é um importante indicador da tolerância à seca (Riyazuddin et al., 2022; Haghpanah et al., 2024;), esses resultados sugerem que *MdDHN11* contribui para reduzir os efeitos da desidratação nos tecidos vegetais. Essa interpretação é consistente com estudos que atribuem às desidrinas funções relacionadas à retenção de água e à proteção celular durante o déficit hídrico (Guo et al., 2019; Riyazuddin et al., 2022).

A avaliação fenotípica após a reidratação corroborou os resultados de potencial hídrico foliar. As linhagens DHN11-13 e DHN11-14 apresentaram melhor recuperação do crescimento após o restabelecimento da irrigação, indicando que a maior manutenção do estado hídrico durante o déficit hídrico favoreceu a recuperação pós-estresse. Esses resultados sugerem que a manutenção do estado

hídrico durante o período de estresse contribuiu para aumentar a capacidade de recuperação das plantas após a reidratação.

A eficiência fotoquímica do fotossistema II não diferiu entre as linhagens transgênicas e a WT. Embora os valores de F_v/F_m tenham diminuído ao longo do déficit hídrico, a resposta foi semelhante em todas as linhagens. Esse resultado sugere que o período de estresse empregado não foi suficientemente severo para provocar danos diferenciais ao aparato fotossintético ou para discriminar linhagens com maior tolerância com base nessa variável fisiológica.

A ausência de diferenças em F_v/F_m , associada às alterações observadas no potencial hídrico foliar, sugere que o estado hídrico das plantas foi afetado antes da ocorrência de danos fotoquímicos detectáveis. Esse comportamento é consistente com estudos que demonstram que parâmetros relacionados ao estado hídrico respondem precocemente ao déficit hídrico, enquanto reduções em F_v/F_m geralmente são observadas apenas sob condições de estresse severo (Živčák et al., 2008; Zuo et al., 2025).

A ausência de diferenças significativas na produção entre as linhagens transgênicas e a WT sugere que o período de déficit hídrico empregado, embora suficiente para induzir alterações fisiológicas e fenotípicas, não foi suficientemente intenso para promover impactos contrastantes sobre o rendimento. Esse resultado é consistente com a ausência de diferenças na eficiência fotoquímica do fotossistema II, indicando que o estresse aplicado não comprometeu de forma diferencial processos diretamente relacionados à produção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. M.; TINOCO, M. L. P.; RIETH, A. F.; MAIA, F. C. O.; ARAGÃO, F. J. L. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016. DOI: 10.1111/ppa.12447.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, v. 79, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1007/s10725-015-0113-3.
- BRASILEIRO, A. C. M.; GUIMARÃES, L. M. S. *Agrobacterium: transformando plantas*. Brasília: Embrapa, 2015.
- CHEN, J.; KANG, S.; DU, T.; QIU, R.; GUO, P.; CHEN, R. Modeling relations of tomato yield and fruit quality with water deficit at different growth stages under greenhouse condition. *Agricultural Water Management*, v. 146, p. 131–148, 2014. DOI: 10.1016/j.agwat.2014.07.026.
- CHOWDHURY, R. H.; BHATTACHARJEE, A.; ISLAM, T. et al. Drought-responsive genes in tomato: meta-analysis of gene expression using machine learning. *Scientific Reports*, v. 13, p. 19374, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-45942-2.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15, 1987.
- EGEA, I.; FLORES, F. B.; BIANCHI, G. et al. Improving production and fruit quality of tomato under abiotic stress: genes for the future of tomato breeding for a sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, v. 204, p. 105086, 2022. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2022.105086.
- FALAVIGNA, V. S.; PORTO, D. D.; MIOTTO, Y. E. et al. Characterization of the nucellus-specific dehydrin MdoDHN11 demonstrates its involvement in the tolerance to water deficit. *Plant Cell Reports*, v. 38, p. 1025–1040, 2019. DOI: 10.1007/s00299-019-02428-8.
- FAN, J.; ZHANG, Y.; SUN, H. et al. Overexpression of soybean GmDHN9 gene enhances drought resistance of transgenic *Arabidopsis*. *GM Crops & Food*, v. 15, n. 1, p. 118–129, 2024. DOI: 10.1080/21645698.2024.2327116.
- GALAU, G. A.; HUGHES, D. W.; DURE, L. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, v. 7, n. 3, p. 155–170, 1986. DOI: 10.1007/BF00021327.
- GARAY-ARROYO, A.; COLMENERO-FLORES, J. M.; GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A. A. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 8, p. 5668–5674, 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5668.
- GUO, X.; ZHANG, L.; WANG, X. et al. Overexpression of *Saussurea involucre* dehydrin gene SiDHN promotes cold and drought tolerance in transgenic tomato plants. *PLoS ONE*, v. 14, n. 11, e0225090, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0225090.

HAGHPANAH, M.; HASHEMIPETROUDI, S.; ARZANI, A.; ARANITI, F. Drought tolerance in plants: physiological and molecular responses. *Plants*, v. 13, n. 21, p. 2962, 2024. DOI: 10.3390/plants13212962.

KNAPP, S.; PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. In: CAUSSE, M.; GIOVANNONI, J.; BOUZAYEN, M.; ZOUINE, M. (ed.). *The Tomato Genome*. Berlin: Springer, 2016. p. 7–21. DOI: 10.1007/978-3-662-53389-5_2.

LIU, Y.; SONG, Q.; LI, D. et al. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1018, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01018.

MARTÍNEZ, L. M.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A. M.; REY, P. J. et al. Over-expression of the *Brachypodium* dehydrin gene, *BdDHN3*, enhances drought tolerance in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *Plant Physiology Reports*, v. 30, p. 942–950, 2025. DOI: 10.1007/s40502-025-00905-9.

MUÑOZ-MAYOR, A.; PITA, P.; LASTRA, B. et al. Improving water use efficiency and drought tolerance in tomato by overexpression of the *tas14* gene. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 13, p. 5037–5050, 2012.

NGONGOLO, K.; MMBANDO, G. S. Harnessing biotechnology and breeding strategies for climate-resilient agriculture: pathways toward sustainable global food security. *Discover Sustainability*, v. 5, p. 431, 2024. DOI: 10.1007/s43621-024-00653-0.

NSELE, S. N.; OGUGUA, U. V.; KANU, S. A.; ADRIAANSE, P. Recent insights into tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivations in deep water culture systems. *Discover Sustainability*, v. 7, p. 629, 2026. DOI: 10.1007/s43621-026-02965-9.

PALMGREN, M.; SHABALA, S. Adapting crops for climate change: regaining lost abiotic stress tolerance in crops. *Frontiers in Science*, v. 2, art. 1416023, 2024. DOI: 10.3389/fsci.2024.1416023.

PASIN, F.; ZHANG, Y.; LU, Y.; GARCÍA, B.; SIMON-MATEO, C. Advances in tomato functional genomics and biotechnology for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, v. 22, n. 2, p. 215–233, 2024. DOI: 10.1111/pbi.14125.

RIYAZUDDIN, R.; NISHA, N.; SINGH, K.; VERMA, R.; GUPTA, R. Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. *Plant Cell Reports*, v. 41, p. 519–533, 2022. DOI: 10.1007/s00299-021-02720-6.

SUN, H.-J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006. DOI: 10.1093/pcp/pci251.

WANG, Y.; SUN, C.; YE, Z.; LI, C.; HUANG, S.; LIN, T. The genomic route to tomato breeding: past, present, and future. *Plant Physiology*, v. 195, n. 4, p. 2500–2514, 2024. DOI: 10.1093/plphys/kiae248.

ŽIVČÁK, M.; OLISOVSKÁ, K.; SLAMKA, P.; GALAMBOŠOVÁ, J.; BRESTIČ, M. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment*, v. 54, n. 4, p. 133–139, 2008.

ZUO, G.; LIU, Y.; ZHANG, Y. et al. Enhancing early drought detection in plants: the consideration of organ sensitivity, parameter selection and measurement timing. *Plants*, v. 14, n. 11, p. 1571, 2025. DOI: 10.3390/plants14111571.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A transformação genética do tomateiro Micro-Tom com os genes *MdGolS2* e *MdDHN11* resultou na obtenção de linhagens transgênicas estáveis, capazes de transmitir os transgenes às gerações subsequentes. A expressão de *MdGolS2* promoveu aumento significativo da tolerância ao déficit hídrico, refletido na maior manutenção da eficiência fotoquímica, melhor recuperação do potencial hídrico foliar após a reidratação e maior produção sob condições de estresse. Entre as linhagens avaliadas, a L2 destacou-se por apresentar os maiores níveis de expressão do transgene e o melhor desempenho fisiológico e produtivo.

A expressão de *MdDHN11* contribuiu para a manutenção do estado hídrico das plantas durante o déficit hídrico e favoreceu a recuperação após a reidratação, com destaque para a linhagem DHN11-13. Resultados demonstram que ambos os genes contribuem para a tolerância à seca em tomateiro, embora atuem por mecanismos distintos. O gene *MdGolS2* apresentou maior potencial biotecnológico por associar aumento da tolerância ao déficit hídrico à manutenção da produção, característica essencial para o desenvolvimento de cultivares adaptadas a ambientes com restrição hídrica.

A principal perspectiva deste trabalho é a piramidação dos genes *MdGolS2* e *MdDHN11* em um mesmo genótipo de tomateiro, com o objetivo de combinar os mecanismos complementares de tolerância ao déficit hídrico identificados neste estudo. Espera-se que a coexpressão desses genes potencialize a capacidade de adaptação das plantas à seca, reunindo os efeitos associados à manutenção do estado hídrico, à preservação da eficiência fisiológica e à manutenção da produção sob condições de restrição hídrica.

Além disso, pretende-se realizar a introgressão desses genes em cultivares comerciais de tomateiro, com o objetivo de aumentar a tolerância ao déficit hídrico, contribuir para a manutenção da produção em cenários de mudanças climáticas e promover maior eficiência no uso da água, reduzindo os custos de irrigação.