



**Universidade
Estadual de Londrina**

MAGDA APARECIDA BENEVENTI

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA PELA
INSERÇÃO DA CONSTRUÇÃO GÊNICA CONTENDO A
REGIÃO PROMOTORA DO GENE *rd29A* E A REGIÃO
CODANTE DO GENE *DREB1A* DE *Arabidopsis
thaliana*, VISANDO TOLERÂNCIA À SECA**

LONDRINA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

MAGDA APARECIDA BENEVENTI

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA PELA INSERÇÃO DA
CONSTRUÇÃO GÊNICA CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA
DO GENE *rd29A* E A REGIÃO CODANTE DO GENE *DREB1A* DE
Arabidopsis thaliana, VISANDO TOLERÂNCIA À SECA**

**Londrina
2006**

MAGDA APARECIDA BENEVENTI

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA PELA INSERÇÃO DA CONSTRUÇÃO GÊNICA CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *rd29A* E A REGIÃO CODANTE DO GENE *DREB1A* DE *Arabidopsis thaliana*, VISANDO TOLERÂNCIA À SECA.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Londrina
2006

MAGDA APARECIDA BENEVENTI

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM SOJA PELA INSERÇÃO DA CONSTRUÇÃO GÊNICA CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *rd29A* E A REGIÃO CODANTE DO GENE *DREB1A* DE *Arabidopsis thaliana*, VISANDO TOLERÂNCIA À SECA.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Embrapa Soja

Orientador

Dr. Elíbio Rech

Embrapa Cenargen

Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor

Embrapa Soja

DEDICO

*À minha mãe Odete,
exemplo de dedicação, amor e bondade.
Eu jamais teria conseguido sem você!*

OFEREÇO

Aos meus familiares, em especial aos meus avós

Aparecida e Antônio Beneventi,

“na simplicidade do conhecimento nunca deixaram de nos educar e nos amar”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual de Londrina, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e ao JIRCAS (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*) pela realização da dissertação.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, pelos exemplos de profissionalismo, competência, honestidade e companheirismo, os quais aprecio com respeito e admiração. Obrigada por toda credibilidade, respeito e amizade. Levarei comigo todos esses ensinamentos.

Aos queridos amigos da equipe de transformação, essenciais na realização desse trabalho, Silvana Marin, César Silveira, Solange Lugle, Noéle Giacomini, Vera Pierotti, Amanda Rolla, Aguida Morales, Adriana Polizel e Wilson Brasil. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, dedicação e amizade. A vocês minha imensa gratidão!

Ao Dr. Naoki Yamanaka, por toda ajuda, conselhos e credibilidade. Muito obrigada.

Ao Dr. Eliseu Binneck, por todos os ensinamentos e conselhos durante a execução do trabalho.

À Dr^a. Maria Cristina Neves de Oliveira, por toda sua ajuda, interesse e colaboração.

À Renata Fuganti, por me ensinar “os primeiros passos” a caminho da pesquisa e da ciência e transmitir seu conhecimento sempre com alegria e bom humor.

Aos meus pais Odete e Osmar, que sempre se dedicaram à família, ajudando-me em todas as situações. Meu amor e eterno agradecimento!

Aos meus amados irmãos Wésley e Willian, e minhas cunhadas Melissa e Marcela, pela paciência, apoio e carinho. Muito obrigada.

Aos meus tios Edgard e Alice Pereira por todo amor e meus primos Keila, Sirlene, Fábio, Vitória, Gian e Gielle Pereira por serem minha segunda família e sempre me apoiarem e me incentivarem na busca dos meus ideais. A vocês minha gratidão e todo meu amor!

Às minhas queridas amigas Lizandra Catelli, Fernanda Piuga e Danielle Gregório. Obrigada por estarem comigo me ajudando e apoiando em todos os momentos, principalmente “os mais difíceis” e por dividirem comigo as alegrias e tristezas. Jamais me esquecerei. Amo muito vocês!

À querida amiga Renata Stolf, pelo carinho e amizade, sempre me ensinando e sugerindo preciosas idéias, demonstrando o cada dia ser uma grande profissional.

Aos novos e queridos amigos, Sandra Oda, Viviane Marçal, Rodrigo e Angélica Brogin, Maria Paula, Cláudio Lísia Gonçalves, Ana Paula Peruca e Cláudia A. A. de Paula pela amizade e alegria contagiante. Vocês estarão sempre em meu coração!

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática, Lívia Nogueira, André Passianotto, Camila Lazzari Nunes, Nilson Vieira e Jairo Silva, pela ótima convivência e carinho proporcionado.

Aos grandes amigos Eder Baptista, Adriane Gonçalves e Marina Oliveira que acompanharam a minha trajetória, torcendo junto nos momentos de ansiedade e celebrando todas as conquistas. Obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem em meus ideais.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| Lista de Tabelas..... | i |
| Lista de Figuras..... | ii |
| Resumo..... | iii |
| Abstract..... | vi |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 6 |
| 2.1. Mecanismos de resposta ao déficit hídrico em plantas..... | 6 |
| 2.1.1. Mecanismos morfológicos e fisiológicos..... | 6 |
| 2.1.2. Mecanismos moleculares..... | 9 |
| 2.1.3. Fator de transcrição DREB..... | 15 |
| 2.2. Transformação genética de plantas..... | 22 |
| 2.2.1. Métodos de transformação genética de plantas..... | 22 |
| 2.2.2. Plantas geneticamente modificadas tolerantes à seca..... | 27 |
| 2.2.3. Principais métodos de transformação genética em soja..... | 30 |
| 2.2.4. Genes marcadores de seleção em plantas..... | 32 |
| 2.3. Métodos de análises molecular de plantas geneticamente modificadas..... | 37 |
| 3. Objetivos | 41 |
| 3.1. Objetivo geral | 41 |
| 3.2. Objetivo específico..... | 41 |
| 4. Artigo..... | 42 |
| 4.1 Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene <i>rd29A</i> e a região codante do gene <i>DREB1A</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , visando tolerância à seca..... | 42 |

| | |
|--|-----|
| 5. Considerações Finais..... | 69 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 71 |
| 7. Anexos..... | 81 |
| 7.1. Anexos I – Protocolos..... | 82 |
| 7.2. Anexos II – Meio de cultura e Soluções..... | 113 |

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica.....página

Tabela 1 – Genes de *Arabidopsis thaliana* induzidos pelo fator de transcrição
DREB1A.....20

Artigo **página**

Tabela 1 – Resultados obtidos pelo processo de transformação.....56

Tabela 2 – Relação das plantas positivas para as construções *rd29A:DREB1A*, *rd29A:Gus* e
AHAS.....57

LISTA DE FIGURAS

| Artigo | página |
|---|---------------|
| <p>Figura 1 – Construções utilizadas na transformação, <i>rd29A</i>:DREB1A, <i>rd29A</i>: <i>GUS</i> e pAC321. Os <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos e o tamanho dos produtos gerados estão indicados na figura.....</p> | 50 |
| <p>Figura 2 – Exemplos de géis de agarose utilizados na confirmação do gene inserido.....</p> | 57-58 |
| <p>Figura 3 – Ensaio histoquímico demonstrando a expressão de <i>GUS</i> dirigido pelo promotor <i>rd29A</i> em embriões de soja (a) e tecido foliar (b), induzidos por desidratação celular. A- 35S:<i>GUS</i>, controle. B- <i>rd29A</i>:<i>GUS</i> planta P1234. C- <i>rd29A</i>:<i>GUS</i> planta 1251. D- <i>rd29A</i>:<i>GUS</i> planta 1263A.....</p> | 59 |
| <p>Figura 4 – Curva de eficiência dos genes <i>GmRNAr18S</i> (rosa) e <i>AtDREB1A</i> (verde).....</p> | 60 |
| <p>Figura 5 – Nível de expressão do transgene <i>AtDREB1A</i> em soja no experimento 1, correspondente aos tratamentos utilizados: plantas controle negativo (P232 e BR-16), P58-R0 estressada (24 horas após a planta ter sido submetida a déficit hídrico total) P58-R0 depois estresse (30 dias após a reidratação), P58-R0 não estressada e branco (sem DNA).....</p> | 61 |
| <p>Figura 6 – Nível de expressão do transgene <i>AtDREB1A</i> em soja sob condições normais e tratamento de desidratação celular durante 90 minutos. Amostras: AHAS e BR16, utilizadas como controles negativos; P58-R0 e P58-R1-01, contendo o gene alvo e branco.....</p> | 62 |

Figura 7 – Curva de dissociação para o gene *AtDREB1A*. O círculo em vermelho indica a formação de dímeros de *primers*.....63

Figura 8 – Gel de poliacrilamida do gene *AtDREB1A* amplificado pela técnica de PCR em tempo real.....63

Resumo

No Brasil a soja é um dos principais produtos da economia nacional refletindo em vários setores da sociedade, principalmente aqueles que possuem renda diretamente relacionada aos complexos de produção, transporte, e comercialização, movimentando cerca de US\$ 50 bilhões anuais, ao longo da extensa cadeia produtiva. Apesar dos aspectos positivos relacionados à cultura, estresses abióticos como a seca tem afetado constantemente a cultura da soja no país, reduzindo os rendimentos. Em resposta ao déficit hídrico as plantas desencadeiam um complexo de mecanismos de respostas em nível, molecular, fisiológico e morfológico. Em nível molecular, a expressão de uma série de genes tem sido demonstrada em resposta ao déficit hídrico. O produto desses genes pode ser classificado basicamente dentro de dois grupos: aqueles que atuam diretamente na proteção celular e aqueles que regulam a expressão e a transmissão de sinais em resposta ao estresse. Em particular, uma família de fatores de transcrição em *Arabidopsis thaliana* conhecida como DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) ou CBF (*C-Repeat-Binding factor*) tem sido estudada. A proteína DREB1A é um fator de transcrição responsável pela ativação de uma série de genes envolvidos na defesa celular contra a desidratação, que ocorre quando plantas são submetidas à seca, frio e/ou salinidade. A inserção do vetor de expressão contendo a proteína DREB1A e o promotor *rd29A*, estresse-induzido, ambos de *A. thaliana*, tem permitido o aumento da tolerância à seca em várias espécies como arroz, trigo, tabaco e *A. thaliana*. Visando a obtenção de genótipos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca, os vetores de expressão pBIG *rd29A*:DREB1A e pBI*rd29A*:*GUS* foram inseridos em embriões de soja pela técnica de biobalística. Através desse processo de transformação, foi possível introduzir as construções *rd29A*:DREB1A e *rd29A*:*GUS* em soja, com uma eficiência aproximada de 1,8%. A estabilidade de transmissão do transgene foi confirmada na geração R1. Análises histoquímicas com GUS permitiram identificar a indução do promotor *rd29A* em tecido foliar sob condições de desidratação celular e verificar a eficiência do processo de transformação em embriões, ambos transformados com a construção *rd29A*:*GUS*. O uso da técnica de PCR em tempo real, permitiu detectar a indução do promotor *rd29A* de *A. thaliana* em folíolos de plantas de soja transformadas com a construção *rd29A*:DREB1A submetidas a tratamento de desidratação celular, assim como, aumento do fator de transcrição *AtDREB1A*. Esses resultados indicam que o promotor *rd29A* de *A. thaliana* é ativado em soja em condições de desidratação celular, promovendo a expressão do fator de transcrição *AtDREB1A*. Análises sobre o aumento do nível de expressão de genes ativados por *AtDREB1A* e de tolerância ao déficit hídrico em soja estão sendo iniciadas.

Palavras-chave: Seca, fator de transcrição, expressão gênica, biobalística, PCR em tempo real.

Abstract

Soybean is one of the most important crops for Brazilian economy, reflecting its importance in many sectors, mainly in those directly related to the production complex, transport, and commercialization, stroking US\$ 50 billions annually. In spite of these positive aspects, abiotic stresses such as drought have affected Brazilian soybean production by causing significant yield losses. In response to drought stress, plants trigger a range of mechanisms responses at molecular, physiological, and morphological levels. The expression of several genes has been demonstrated to be activated by drought stress. The product of these genes can be classified into two groups basically: those which act directly in cell protection, and those that regulate the expression and transduction of stress-response signals. One family of transcription factors have been extensively studied in *Arabidopsis thaliana*. This family is known as DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) or CBF (*C-Repeat-Binding factor*). The DREB1A protein is one of the transcriptions factors responsible for activation of genes involved in cellular defense to drought stress, which occurs when plants are submitted to drought, freezing, or salinity. The insertion of the DREB1A gene and the (stress-inducible) promoter, *rd29A* from *A. thaliana*, has allowed an increase in drought tolerance in some species such as rice, wheat, tobacco, and *A. thaliana*. Aiming to obtain soybean genotypes genetically modified to drought tolerance, in the present work the expression vectors containing *rd29A*:DREB1A and *rd29A*:*GUS* were inserted into soybean embryos by biolistic technique. Using this transformation process, it was possible to introduce both constructions in soybean with an efficiency of 1.8%. The stability of inheritance for these transgenes was confirmed in T1 generation. Histochemical analyses with GUS lead to the identification of the induction of *rd29A* promoter in leaf tissue under cellular dehydration conditions, as well as the confirmation of the transformation efficiency when using *rd29A*:*GUS* construction. Real-time PCR technique was used for detection of induction of *rd29A* promoter of *A. thaliana* in leaflets of soybean plants transformed with *rd29A*:DREB1A construction when submitted to the cellular dehydration treatment, as well as for detection of an increase in the expression of the transcription factor, DREB1A. These results indicate that the promoter *rd29A* of *A. thaliana* is activated in soybean in cellular dehydration conditions, promoting the expression of the transcription factor DREB1A. Analyses on the raise in the expression level of genes activated by DREB1A and the drought tolerance itself have been recently initiated.

Key words: drought, transcription factor, gene expression, biobalistic, Real-time PCR.

1. Introdução

Previsões ambientais sinalizam para o aquecimento global nas próximas décadas e situações de secas, muito provavelmente, acompanharão esse evento (Nepomuceno et al., 2001).

De acordo com informações globais geradas pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) em junho de 2005, países como Botswana, Cuba, Moçambique, Swaziland, Kenya, Zâmbia, Malawi e Zimbaue, apresentam perspectivas desfavoráveis para colheitas de culturas devido à seca. Na Ásia, as secas severas provocaram perdas em diversos países, principalmente a Tailândia, Vietnã, Cambódia, China, e Laos. No Caribe e América Latina, países como Cuba e Haiti foram seriamente afetados por um período de seca prolongada, promovendo um declínio na produção de culturas importantes. Também na Europa, foi prevista uma redução na produção de cereais, devido à seca que persistiu na Espanha e Portugal. Um dos países atingido continuamente por eventos relacionados à seca é a Austrália (*Australian Government- Bureau of Meteorology*, 2005). Em 2005, as colheitas de cereais ficaram abaixo da média devido às secas que persistiram durante o período de plantio (FAO, 2005).

No Brasil a soja é um dos principais produtos da economia nacional refletindo em vários setores da sociedade, principalmente aqueles que possuem renda diretamente relacionada aos complexos de produção, transporte, e comercialização (Bonato e Bonato, 1987) movimentando cerca de US\$ 50 bilhões anuais, ao longo da extensa cadeia produtiva. Somente os ingressos gerados pelas exportações contribuem com mais de US\$ 10 bilhões anuais (Embrapa, 2005). O país atua como o segundo maior produtor mundial de soja com 51,7 milhões de toneladas produzidas na safra 2004/2005. Em 2004 o superávit do agronegócio brasileiro ficou em US\$ 34 bilhões (Agência de Notícias Brasil Árabe -ANBA,

2005) e somente no primeiro trimestre de 2004, registrou-se saldo recorde de US\$ 6,62 bilhões, demonstrando um aumento de 44,7% em relação ao mesmo período em 2003 com um acréscimo sobre o valor exportado superior a US\$ 500 milhões (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil - CNA, 2004). Dados da Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB) estimam uma safra em 2005/06 de 58 milhões de toneladas, superando entre 11,0% e 14,6% a safra de 2004/2005.

Apesar dos aspectos positivos relacionados à cultura de soja no Brasil, estresses abióticos como a seca sempre afetaram a cultura da soja no país, reduzindo os rendimentos especialmente durante a fase reprodutiva. Em safras passadas, como em 1977/78 e 1978/79, a seca ocorrida nos três estados do sul diminuiu a colheita em aproximadamente 7,2 milhões de toneladas de grãos de soja (Farias et al., 1993). Recentemente na safra brasileira 2003/04 foram produzidas 120,1 milhões de toneladas de grãos, uma redução de 2,5% em relação as 123,1 milhões de toneladas colhidas no ano agrícola 2002/03. De janeiro a abril de 2004, a escassez de chuvas nos estados do Sul causou uma perda, somente no Paraná, de aproximadamente 1,9 milhões de toneladas. Já o Rio Grande do Sul foi o mais atingido com uma quebra de 4,1 milhões de toneladas de soja, respondendo pela redução de 47,8% da produtividade da safra no estado. Na região Centro-Oeste, as perdas foram calculadas em 3,4 milhões de toneladas grãos, sendo 2,1 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2004).

A safra seguinte 2004/ 2005 também foi marcada por condições climáticas muito severas. A carência de chuva ocasionou perdas maiores em relação à safra anterior. No início da safra de 2004, havia uma expectativa de produção de 134,9 milhões de toneladas. Após a falta de chuvas que seguiu nos meses de janeiro e fevereiro, a estimativa caiu para 119,5 milhões de toneladas, contabilizando-se um prejuízo de cerca de 15,5 milhões de toneladas. No Rio Grande do Sul, onde os danos foram maiores, constataram-se perdas da

ordem de 6,4 milhões de toneladas. No Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e Goiás, a soja foi a cultura mais prejudicada, com perdas respectivas de: 2,8 milhões de toneladas, 280 mil toneladas e 1,2 milhões de toneladas, respectivamente (IBGE, 2005).

O déficit hídrico provoca alterações no desenvolvimento vegetal cuja irreversibilidade depende do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta em que ocorre o estresse, podendo assim, afetar negativamente os níveis de produção global. Em condições de campo, as plantas são constantemente, expostas a diferentes tipos de estresses ambientais como a seca, resultando em uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, que são induzidas pela planta em resposta ao estresse ambiental visando aumentar a capacidade da planta em tolerar o estresse (Bray, 1993).

Existem alternativas para reduzir a deficiência hídrica como o uso da irrigação. Entretanto, alguns fatores de ordem econômica e, principalmente, a baixa disponibilidade de recursos hídricos, constituem-se como sérios obstáculos para a aplicação dessa solução em larga escala (Boyer, 1996). Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas. No entanto, dificuldades surgem para o melhorista, na quantificação das respostas da planta, ora por falta de metodologia de avaliação adequada, ora pela instabilidade e intensidade de ocorrência do déficit hídrico em condições de campo (Scott e Fischer, 1993). Além disso, considera-se a tolerância à seca como uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada somente pelo melhoramento genético convencional (Beever, 2000).

Com o desenvolvimento de técnicas de biotecnologia, está se tornando possível não só identificar fisicamente todos os genes envolvidos em uma determinada resposta fenotípica, mas também isolar com precisão as seqüências de DNA responsáveis por determinada característica. As técnicas de engenharia genética aliadas a técnicas de

transformação vegetal, têm permitido alterar a composição de componentes individuais de plantas no sentido de aumentar as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue através de práticas de melhoramento convencional.

A transformação genética de plantas é um passo crucial na manipulação gênica e uma importante ferramenta que poderá contribuir para o problema de déficit hídrico, a partir da obtenção de plantas transformadas com a característica de tolerância à seca. Muitos métodos de transformação estão disponíveis, destacando-se o sistema via *Agrobacterium tumefaciens* e a técnica de biobalística (Aragão et al., 2000; Aragão, 2002), utilizados na inserção de genes envolvidos em resposta a desidratação. O produto desses genes pode ser dividido em dois grupos: aqueles que atuam em resposta direta ao déficit hídrico e aqueles que regulam a expressão de genes e atuam na transmissão de sinais em resposta ao déficit hídrico (Oono et al., 2003).

Em resposta a estresses como a seca, as plantas ativam múltiplas vias de sinalização que induzem a transcrição de vários genes levando a uma série de respostas de defesa em níveis celular, fisiológico e agrônomico. Um grande número de fatores de transcrição é encontrado no genoma de plantas e somente em *Arabidopsis thaliana* aproximadamente 5,9% do genoma codifica mais de 1500 fatores de transcrição (Riechmann et al., 2000). A exemplo desses fatores de transcrição, uma família multigênica nomeada DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) ou CBF (*C-repeat Binding Factors*), controla a expressão de diferentes genes como, *rd29A*, *rd17*, *cor6.6*, *cor15a*, *erd10*, *kin1e* *kin2* envolvidos na tolerância a estresses ambientais, como seca, salinidade e frio (Gilmour et al., 1998; Yamagushi-Shinozaki, 2000). O produto desses genes ativado pela proteína DREB1A pode ser classificado em dois grupos: o primeiro grupo incluiria as proteínas semelhantes às proteínas LEA, proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, enzimas necessárias ao metabolismo de açúcares (por exemplo, galactinol sintase) e inibidores de

protease. O segundo grupo conteria fatores protéicos (fatores de transcrição, enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, etc) envolvidos na regulação da expressão de genes de defesa, como por exemplo, proteínas do primeiro grupo (Oono et al., 2003).

A introdução do fator de transcrição DREB1A em *A. thaliana* dirigido pelo promotor 35SCaMV (*cauliflower mosaic virus*) ou o promotor do gene *rd29A*, resultou em aumento nos níveis de expressão de genes estresse-induzidos pela proteína DREB1A, como, *rd29A*, *rd17*, *cor6.6*, *cor15a*, *er10* e *kin1*, resultando em tolerância ao frio, salinidade e déficit hídrico (Kasuga et al, 1999). Entretanto, a expressão constitutiva do fator de transcrição DREB1A dirigido pelo promotor 35S promove retardo ao crescimento mesmo em condições normais, mas esse efeito pode ser reduzido pelo uso do promotor *rd29A* estresse induzido ativado apenas durante condições de déficit hídrico como verificado em plantas de *A. thaliana*, tabaco e trigo (Kasuga et al., 1999; Hsieh et al., 2002; Kasuga et al., 2004).

A utilização de técnicas de transformação genética na introdução de genes e a utilização de estratégias moleculares pela engenharia genética de rotas metabólicas agronomicamente importantes, tem demonstrado ser uma alternativa para o desenvolvimento de variedades mais tolerantes à seca. A introdução da construção *rd29A*:DREB1A em soja através da técnica de biobalística pode ser uma estratégia eficaz na obtenção de genótipos de soja mais tolerantes ao déficit hídrico.

2. Revisão de Literatura

2.1 Mecanismos de resposta ao déficit hídrico em plantas

2.1.1 Mecanismos morfológicos e fisiológicos

O déficit hídrico pode ser definido como a redução de água de um determinado tecido ou célula, que os coloca abaixo do conteúdo de água exibido para a manutenção normal das funções biológicas que ocorrem no estado de maior hidratação (Taiz e Zeiger, 2004). Essa redução afeta consideravelmente, o crescimento e a produtividade das plantas reduzindo a biomassa de raízes, caules, folhas, flores e frutos. O déficit hídrico, originado por esta redução no teor de água em células, órgãos e tecidos, promove uma redução na expansão celular, condutância estomática, fotossíntese e, conseqüentemente, no acúmulo de matéria seca (Kizis et al., 2001). Pimentel e Perez (2001) relataram que vários mecanismos permitem aos vegetais tolerar a falta de água em maior ou menor intensidade, sendo a adaptação à seca uma característica multigênica e, portanto, influenciada por várias características fisiológicas, morfológicas, anatômicas e moleculares.

As plantas quando submetidas à seca, apresentam alguns mecanismos de adaptação que previnem a perda de água para o ambiente e mantêm sua hidratação. Um aspecto importante a ser destacado é o que ocorre nas folhas, como a redução na área foliar; já que com uma área menor a planta transpira menos, conservando, efetivamente, um suprimento de água limitado no solo por um período mais longo. Durante o déficit hídrico o fechamento dos estômatos limita a transpiração, alterando também a temperatura da folha. A manutenção da temperatura foliar dentro de faixas que permitam que as atividades metabólicas sejam mantidas exige a evaporação de grandes quantidades de água. Por isso, as adaptações que esfriam as folhas, por outros métodos além da evaporação, como mudanças no

tamanho, cor, rugosidade e orientação das folhas, são também efetivas na conservação de água. Já fatores indiretos que alteram a intercepção da radiação são a murcha, que altera o ângulo da folha e o enrolamento foliar, que minimiza a superfície exposta ao sol (Taiz e Zeiger, 2004).

Além disso, o desenvolvimento de um sistema radicial mais profundo, melhor adaptado para a captação mais constante de água, permite a planta tolerar o déficit hídrico moderado. Segundo Javot e Maurel (2002) raízes expostas a longos períodos de déficit hídrico podem responder através de alterações anatômicas e de crescimento, os quais induzem mudanças na capacidade de transporte de água. Antes dessas mudanças ocorrerem, alterações na permeabilidade das raízes podem ser observadas. Proteínas de canal de água, como as Aquaporinas, encontradas nas membranas celulares de raízes, têm sido correlacionadas com esses ajustes no transporte de água (Maurel, 1997; Martre et al., 2002).

As bases fisiológicas de tolerância à seca em várias espécies são muito similares. A resposta inicial, à diminuição da água contida no solo, promove a redução da condutância estomática, possibilita manter o potencial de água nas folhas, aumentar a eficiência no seu uso, otimizando o ganho de carbono em períodos de seca. Durante o déficit hídrico, a redução do turgor celular e o aumento da concentração de solutos em folhas, pode indicar a ocorrência de ajuste osmótico ativo. Um dos mecanismos de osmoregulação bem conhecido é o aumento na concentração de prolina, que pode ocorrer paralelamente ao aumento da atividade da enzima nitrato redutase, sugerindo que solutos compatíveis podem contribuir para a manutenção da atividade da enzima (Arndt et al., 2001).

Liu et al. (2003) pesquisaram os mecanismos fisiológicos pelos quais o abortamento de vagens é regulado em soja e verificaram que a seca diminui a taxa fotossintética e o potencial de água em folhas, flores e vagens. Como consequência do déficit hídrico, as concentrações de sacarose e amido diminuem em folhas e ocorre o aumento na

concentração de hexose. A alta taxa de degradação de sacarose e amido deve-se ao aumento na atividade de enzimas como, amilase e sacarose sintase, em folhas, durante períodos de déficit hídrico promovendo o alto nível na concentração de hexose (glicose + frutose). Essa acumulação de hexose em folhas, em situações de déficit hídrico, pode contribuir para a manutenção do turgor celular sendo parte de uma estratégia de aclimação durante o estresse. Entretanto, a baixa disponibilidade de fotossintatos, como sacarose e amido, em folhas, resulta em uma diminuição no fluxo de carboidratos de folhas para vagens. Para o desenvolvimento de vagens é necessária a clivagem de sacarose em hexose pela enzima sacarose sintase, pois a alta taxa de hexose parece favorecer a divisão celular durante o desenvolvimento reprodutivo. A inibição de sacarose para hexose pode inibir a divisão celular em óvulos jovens e paredes de vagens levando a supressão do crescimento e eventualmente o abortamento de vagens. Durante a seca a atividade da enzima sacarose sintase é inibida em estruturas reprodutivas, promovendo um conseqüente acúmulo de sacarose em estruturas reprodutivas.

Em tratamentos de seca, constatou-se que o crescimento de vagens diminuiu, coincidindo com a diminuição da concentração de hexose. A baixa disponibilidade de fotossintatos em folhas e a incapacidade de vagens em utilizar a sacarose resultaram em uma diminuição no fluxo de carboidratos de folhas para vagens; em conjunto com a diminuição da taxa de sacarose para hexose em vagens, esses fatores tornam-se potenciais contribuintes para o abortamento de vagens em soja sob condições de déficit hídrico.

2.1.2 Mecanismos moleculares

Mecanismos de resposta ao déficit hídrico podem ser identificados em níveis moleculares, por toda a planta. Esses mecanismos são controlados pela interação entre o ambiente e a composição genética da planta. Muitos programas de pesquisa têm focado em caracterizar os mecanismos de percepção e sinalização e de respostas moleculares ao déficit hídrico (Xiang et al., 2002; Oono et al., 2003; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2003).

Os modelos de percepção de estresse sendo estabelecidos para vegetais superiores, sugerem uma hipótese para o início de sinalização em nível molecular. Alterações na conformação de membranas celulares devido à perda de turgor provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais críticas, embebidas nas membranas celulares e alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana celular. Devido à perda de pressão da parede, complexos enzimáticos ativados pelas alterações mencionadas, iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (Nepomuceno et al., 2001, Xiang et al., 2002).

Uma resposta precoce ao estresse causado por seca, salinidade e baixa temperatura nas células vegetais, é o aumento de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma, derivado do influxo do espaço apoplástico ou da liberação de estoques internos (Kinight, 2000). O aumento de Ca^{2+} no citoplasma estimula a calmodulina, e o complexo Ca^{2+} /CAM então, ativa certas enzimas, como proteínas quinases e ATPases da membrana plasmática. Essas ATPases, reguladas por este complexo, podem funcionar como transportadores, dirigindo o potássio para dentro e fora das células guardas, regulando a abertura e o fechamento estomático e consequentemente o excesso de transpiração. A elevação na concentração de Ca^{+} ativa canais de efluxo de K^{+} e bloqueia os canais de influxo desse cátion inibindo a abertura estomática. A

perda de K^+ provoca a saída de água da célula guarda, reduzindo sua turgescência e mantendo o estômato fechado. Hosy et al. (2001) estudaram plantas mutantes para o gene *GORK* (*voltage-gated outwardly rectifying K*) que codifica canais de efluxo de potássio e demonstraram que o gene *GORK* codifica o principal canal de efluxo e possui um papel importante no controle do movimento estomático, promovendo uma redução da perda de água por transpiração.

Diferentes genes ativados durante a seca, podem ser divididos e classificados como proteínas funcionais e proteínas regulatórias (Shinozaki et al., 1997; Shinozaki et al., 2000). O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam diretamente na tolerância ao estresse como; proteínas chaperonas e proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), atuando na proteção de macromoléculas como, enzimas, lipídeos, e mRNAs. Prolina, glicina-betaína e açúcares atuam como osmólitos na redução do potencial osmótico e conseqüente manutenção da turgor. Aquaporinas (*Water Channel Proteins*) funcionam como canais de água através da membrana plasmática e tonoplasto durante o ajuste da pressão osmótica em condições de estresse, facilitando o movimento da água através de tecidos. Enzimas detoxificantes, semelhantes à glutationa S-transferase, superóxido dismutase, estão envolvidas na proteção celular contra oxigênio reativo. Proteases como Clp protease e ubiquitina também são necessárias para a regulação e reciclagem de aminoácidos (Shinozaki et al., 1997; Shinozaki et al., 2000). A ubiquitina é um polipeptídeo com 76 aminoácidos, que tem a função de “etiquetar” proteínas que estão destinadas a ser rapidamente proteolizadas no citossol (Lam, 1997). Um outro grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação da transmissão de sinais e na expressão de genes que provavelmente funcionam em resposta ao estresse; proteínas kinases e enzimas do metabolismo de fosfolípidios, participam da modificação e regulação em proteínas envolvidas nas vias de sinais de transmissão do estresse. Fatores de transcrição como DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*)

atuam na regulação funcional de vários genes expressos sob condição de déficit hídrico (Shinozaki et al., 1997; Shinozaki et al., 2000).

Disfunção de enzimas e proteínas geralmente acompanha estresses abióticos. Muitas proteínas, especialmente *Heat Shock Proteins* (HSPs), tem atuado como chaperonas moleculares auxiliando o dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, no redobramento de proteínas desnaturadas e na prevenção ao agregamento de partes de proteínas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, prejudicando o dobramento. Além disso, elas aceleram o dobramento, estabilizando os intermediários e diminuindo as barreiras energéticas de ativação, durante o processo de dobramento (Torok et al., 2001). As HSPs ainda desempenham um importante papel na transmissão de sinais, mantendo o citoplasma da célula e seus compartimentos em estado organizado (Rácz, 2000).

As proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*) são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas, em resposta ao déficit hídrico. Estas proteínas são reconhecidas por serem hidrofílicas, apresentarem alto conteúdo de glicina (maior que 6%) (Garay-Arroyo et al., 2000) e triptofano e estão, provavelmente, localizadas no citoplasma (Dure, 1993). Estudos com proteínas LEA mostram que proteínas similares são acumuladas em sinal a estresses ambientais como déficit hídrico, baixa temperatura, aumento da pressão osmótica externa, dessecação embrionária e ácido abscísico (ABA) exógeno (Close et al., 1993; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996). As prováveis funções das proteínas LEA estão relacionadas ao seqüestro de íons, proteção de membranas (chaperonas), renaturação de proteínas e retenção de água (Bray, 1993; Dure, 1993; Zhu et al., 2001). Portanto, a extrema hidrofília apresentada pelas proteínas LEA e sua abundante expressão durante a maturação de sementes e estresses ocasionados pela desidratação, poderiam certamente implicar em uma função de proteção celular (Dure, 1993).

Algumas plantas ativamente acumulam solutos compatíveis, ou osmólitos, no citoplasma para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter o potencial hídrico e o turgor das células próximo ao nível ótimo, em situações de seca. Quando o turgor é mantido, processos como condutância estomática e taxa de assimilação de CO₂ também são mantidos (Nepomuceno et al., 2001).

Uma das respostas mais estudadas em plantas é o acúmulo de prolina no citoplasma das células durante o déficit hídrico. Esse acúmulo é resultado do aumento do fluxo de glutamato, que é metabolizado pela enzima Pirrolina-5-Carboxilato Sintetase (P5CS), que regula a taxa de biossíntese e de decréscimo no catabolismo da prolina. Esta enzima P5CS, responsável pela transformação da Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) em prolina, tem sua expressão regulada por mudanças no potencial osmótico do citoplasma. Um decréscimo do potencial osmótico da célula leva a um aumento na síntese de P5C e, conseqüentemente, a um aumento da síntese de prolina (Delauney e Verma, 1993). Estudos sugerem que a prolina possa estar envolvida nas respostas de defesa a desidratação pela capacidade de estabilizar estruturas celulares e eliminar radicais livres, depósito de energia, participar como componente da cascata de sinalização molecular do estresse e ser o principal constituinte de proteínas de parede celular em plantas (Nanjo et al., 1999). Yamada et al. (2005) através de transformação genética em *Petúnia hybrida* cv. 'Mitchell', com os genes Δ ¹-pyrroline-5-carboxilato sintetase de *Arabidopsis thaliana* (*AtP5CS*) e (*OsP5CS*) de *Oryza sativa*, verificaram que as plantas transgênicas acumularam de 1.5- 2.6 vezes mais prolina do que plantas crescidas sob condições normais. As linhagens transgênicas toleraram 14 dias de déficit hídrico, confirmando a eficiência dos transgenes *P5CS*.

Betaínas são compostos amino quaternários, isto é, aminoácidos derivados em que o átomo de nitrogênio é completamente metilado. Em plantas, glicina-betaína, um membro representativo deste grupo de osmólitos, é sintetizado no cloroplasto por dois

processos: o primeiro passo converte colina em betaína aldeído, que pode ser induzido por seca e salinidade; o segundo passo converte betaína aldeído em glicina-betaína, que é catalisada pela enzima betaína aldeído desidrogenase (Wang et al., 2003). O acúmulo de glicina-betaína é um fator importante para a engenharia genética em relação à tolerância ao estresse. A idéia de que glicina-betaína pode aumentar a tolerância ao estresse é baseado em trabalhos como o verificado em milho onde uma mutação para a síntese de glicina-betaína reduziu a tolerância ao sal e ao calor (Yang et al., 1996). Entretanto, em plantas de trigo o acúmulo de glicina-betaína contribuiu para a tolerância a salinidade (Colmer et al., 1995).

Genes envolvidos no metabolismo de açúcares/polióis têm sido utilizados para a superprodução de solutos compatíveis (Weng et al., 2003). Trehalose (α -D-glucopyranosyl-[1,1]- α -D-glucopyranoside) é um dissacarídeo composto de duas moléculas de glicose presente em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, insetos e algumas plantas (Elbein, 1979; Elbein et al., 2003). Esse dissacarídeo não serve apenas como uma reserva de carboidratos, mas também como uma molécula protetora estabilizando proteínas e membranas celulares, em inativação ou desnaturação, ocasionadas por uma variedade de estresses químicos e físicos como, dessecação, desidratação, oxidação, calor, seca e frio (Elbein et al., 2003). Avonce et al. (2004) verificaram que a super expressão do gene *AtTPSI* que codifica a enzima trehalose-6-fosfato sintase na via biossintética de trehalose em *A. thaliana*, promoveu um aumento nos níveis de trehalose-6-fosfato fosfatase, também pertencente a essa via biossintética e demonstrou tolerância à seca.

Um importante avanço para o entendimento da condutância de água nas células foi à descoberta das proteínas de canais de água, denominadas aquaporinas. A presença de aquaporinas pode aumentar a condutividade hidráulica da membrana (Preston, et al., 1992) e formar canais de água específicos para íons ou solutos (Bray, 1993). Sakuray et al., (2005) identificaram 33 genes para aquaporinas no genoma de arroz, os quais

demonstraram grandes níveis de expressão constatados pela técnica de PCR em tempo real durante períodos de estresse.

Fosfolipídios possuem um papel importante durante o déficit hídrico atuando como precursores na geração de moléculas secundárias. A fosfolipase C (PI-PLC) hidroliza phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Estresse como a seca, produz um aumento no nível de expressão de PI-PLC contribuindo para a clivagem de PIP₂ produzindo duas moléculas importantes, diaciglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃), as quais atuam como mensageiros secundários e podem ativar a proteína Kinase C e a liberação de Ca²⁺ (Xiong et al., 2002). Schroeder et al. (2001) observaram a função exógena de IP₃ em plantas na liberação de Ca²⁺. A inibição da atividade de PI-PLC eliminou o aumento de IP₃ e inibiu a indução do estresse osmótico de genes como *rd29A* e *COR47* que estão envolvidos em resposta de proteção contra estresses ambientais (Takahashi et al., 2001).

Estresses abióticos também causam a superprodução de oxigênios reativos (*Reactive Oxygen Sintheis* - ROS). A degradação de membranas lipídicas, resulta em ácidos graxos livres, inicia a deterioração oxidativa pela promoção de um substrato para a enzima lipoxigenase, causando então, uma peroxidação na membrana. A peroxidação produz *alkoxy*, radicais peróxido, bem como *singlet oxygen*, essas reações na membrana são a maior fonte de ROS em células de plantas (Bhattacharjee, 2005). Para eliminar esses compostos tóxicos, as plantas têm desenvolvido estratégias, através da produção de antioxidantes, que incluem enzimas como, catalase, superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona redutase; assim como moléculas não enzimáticas, como ascorbato, glutaciona, carotenóides e antocianinas (Bowler et al., 1992; Noctor e Foyer, 1998). Entretanto, sobrepondo o papel de ROS como um agente oxidativo, descobriu-se um novo papel para ROS em processos de sinalização. Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) atua como um mensageiro secundário mediando à aquisição de tolerância a ambos os estresses, biótico e abiótico.

Também foi verificado que ROS comunica-se com outras moléculas sinalizadoras formando parte de vias de sinalização que controlam respostas procedentes a ROS. (Bhattacharjee, 2005).

Genes para uma variedade de fatores de transcrição, que contêm domínios semelhantes a bZIP, MYB, MYC, ERF/AP2 e Zinc fingers, são induzidos por estresse. Esses fatores de transcrição atuam na regulação funcional de vários genes expressos sob condição de déficit hídrico (Bray, 1997; Shinozaki et al., 2000). Várias proteínas kinases, semelhantes à MAP kinases, proteínas kinases dependentes de cálcio (CDPK), SNF1 relacionado à proteína kinase, demonstram ser induzidas ou funcionar como reguladoras de promotores de genes no processo de desidratação (Mizoguchi et al., 1997; Shinozaki et al., 2000). As proteínas kinases e fosfatases estão envolvidas na modificação da função de proteínas e na regulação de proteínas envolvidas nas vias de sinais de transmissão do estresse.

2.1.3 Fator de transcrição DREB

Nas últimas décadas, importantes progressos foram obtidos na compreensão de como estresses ambientais como seca, salinidade e baixa temperatura controlam a expressão de genes. Em particular, uma família de fatores de transcrição em *Arabidopsis thaliana* conhecida como DREB (DREB1A, DREB1B, DREB1C e DREB2) (Liu et al., 1998; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002) ou CBF (*C-Repeat-Binding factor*) (CBF3, CBF1, CBF2) correspondentes a DREB1A, 1B e 1C, respectivamente (Stockinger et al., 1997; Gilmour et al., 1998), foram identificados. Recentemente, outros genes também homólogos a essa família, *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D*, e *OsDREB2A* foram isolados em

arroz (Dubouzet et al., 2003), *GmDREBa*, *GmDREBb* e *GmDREBc*, em soja (Li et al., 2005) e *ZmDREB1A* em milho (Qin et al., 2004).

Yamaguchi-Shinozaki et al. (1992) realizaram os primeiros trabalhos sobre o fator de transcrição DREB, identificando nove DNAs complementares (DNAc) nomeados RD (*Responsive to Desiccation*) de *A. thaliana*. Análises de *Northern blot* revelaram ampla variação no tempo de indução de genes RD, em resposta não somente a déficit hídrico, mas também, estresse salino, baixa temperatura e ácido abscísico (ABA).

Os genes *rd29A* e *rd29B* correspondentes ao clone RD29, foram então caracterizados. Análises das proteínas RD29A e RD29B revelaram que essas proteínas RD29 são extremamente hidrofílicas, e contém somente um resíduo de cisteína, o que as torna similar à estrutura das proteínas LEA também induzidas por dessecação (Baker et al., 1988; Yamaguchi e Shinozaki, 1993; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002).

Em tratamentos de desidratação em plantas de *A. thaliana*, o gene *rd29A* foi detectado em níveis de expressão baixos dentro de vinte minutos e altamente expresso depois de três horas, enquanto *rd29B* foi detectado somente após três horas do início da desidratação. Entretanto, quando foram feitos tratamentos com aplicação de ABA, essa rápida indução de *rd29A* não foi detectada, mas após duas horas a expressão de ambos, *rd29A* e *rd29B*, foi detectada. Esses resultados sugerem a ausência de algum elemento envolvido na rápida indução de *rd29A* em tratamento de desidratação. A expressão de *rd29A* quando analisada em plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco contendo o promotor *rd29A* fusionado ao gene repórter β -Glucoronidase (GUS), confirmou os resultados obtidos durante os tratamentos de desidratação e ABA (Yamaguchi e Shinozaki, 1993).

Tais observações propõem a existência de dois elementos *cis*-atuantes na região promotora de *rd29A*, sendo um deles relacionado a mudanças no potenciais osmótico e hídrico da célula, ou seja, independente de ABA e responsável pela rápida indução de *rd29A*

durante estresse ambiental e outro dependente de ABA, envolvido na resposta a expressão do hormônio ABA. Os genes *rd29B* e *rd29A* estão arrançados em *tandem*, em uma região de 8kb no genoma de *A. thaliana*, um espaço de aproximadamente 1640 pb entre *rd29B* e *rd29A*, conteria esses elementos *cis*-atuante.

Análises de deleção e de substituição de bases na região promotora do gene *rd29A* em plantas transgênicas de tabaco revelaram uma seqüência conservada de 9 pares de bases (TACCGACAT) nomeada DRE (*Dehydration Responsive Element*), que possui alta similaridade com a seqüência DR1 (*Responsive to dehydration*) do promotor *rd17*, sendo essencial na regulação da expressão de *rd29A* sob condições de seca (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K., 1994). A seqüência CCGAC do elemento DRE é a seqüência mínima para que ocorra a ligação da proteína ao promotor e, C4, G5 e C7 são essenciais para interação de proteínas específicas (Hao et al., 2002; Sakuma et al., 2002). O elemento ABRE (*ABA Responsive Element*) também foi identificado e estaria envolvido na indução do promotor *rd29A* durante a presença de ABA (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K., 1994).

Através da técnica de ensaio de um híbrido (*One-Hybrid Assay*), Liu et al. (1998) isolaram clones de DNAC que codificam proteínas (DREB1A e DREB2A) que se ligam à região DRE. A seqüência de aminoácidos das proteínas DREB1A e DREB2A mostrou alta similaridade com o domínio conservado encontrado na proteína Apetala2 (AP2) de *A. thaliana* (Jofuku et al., 1994; Okamuro et al., 1997) que funciona em resposta a morfogênese floral, e com a proteína ERF (*Ethylene-responsive element binding factors*) que funciona em resposta ao etileno (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Hao et al., 2002). Apesar do domínio AP2 das proteínas DREB terem alta similaridade com o mesmo domínio nas proteínas ERF, não é claro como essas proteínas reconhecem diferentes sítios e regulam a expressão de genes em vias diferentes (Sakuma et al., 2002).

O domínio AP2 tem sido considerado exclusivo de plantas e possui uma região conservada de aproximadamente 60 aminoácidos (Riechmann e Meyerowitz, 1998). Entretanto, as proteínas DREB contêm uma região básica na região N-terminal que pode funcionar como um sinal de localização nuclear e uma região C-terminal ácida que atua como um domínio de ativação para a transcrição, indicando que essas proteínas podem funcionar como um ativador de transcrição em plantas (Liu et al., 1998; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002).

Um grande número de genes expressos em condições de déficit hídrico ativados pela proteína DREB1A em resposta a seca já foram identificados através de técnicas como os microarranjos de DNA (Kasuga et al., 1999; Seki et al.; 2001; Oono et al., 2003; Murayama et al., 2004) e o produto desses genes apresenta alta homologia com proteínas conhecidas, permitindo agrupá-los em categorias funcionais. Kasuga et al. (1999) identificaram seis genes induzidos pela proteína DREB1A, envolvidos na tolerância a estresses como seca, salinidade e frio: *rd29A*, *kin1*, *kin2/cor6.6*, *cor15a*, *rd17/cor47* e *erd10*. Seki et al. (2001) identificaram outros seis genes, *FL3-5A3*, *FL5-2I22*, *FL5-94*, *FL5-77*, *FL3-27* e *erd4*, envolvidos em resposta à seca e controlados por DREB1A. Oono et al. (2003) identificaram 280 genes estresse-induzidos expressos entre o período de desidratação e reidratação em *A. thaliana*. Entre os genes identificados, um grande número de genes estresse-induzidos são regulados por DREB1A, como *rd29A*, *cor15A*, *Kin1*, *Kin2*, *rd17*, *erd13*, *rd28*, *erd4*, *rd20*, *erd9*, *erd7* e *rd22*. Murayama et al. (2004) identificaram 38 genes estresse-induzidos ativados por DREB1A, durante tratamento de déficit hídrico e frio (Tabela 1).

A percepção do estresse como a seca e a transmissão de sinais que levem a respostas adaptativas são etapas essenciais na determinação do desenvolvimento e reprodução de plantas quando expostas a esse tipo de estresse ambiental. Durante o processo de tolerância

à seca, ocorre a ativação de uma cascata de eventos moleculares dependentes e independentes de ABA, entre o sinal inicial do déficit hídrico e a expressão de genes específicos. Na via independente de ABA encontra-se um grande número de genes induzidos pela proteína DREB1A e esses genes são classificados em dois grupos: o primeiro grupo inclui as proteínas semelhantes às proteínas LEA, proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, enzimas necessárias ao metabolismo de açúcares (por exemplo, galactinol sintase) e inibidores de protease. O segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação de sinais de transdução e expressão de genes, como fatores de transcrição e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios (Oono et al., 2003; Murayama et al., 2004).

Diferentes genes tem sido utilizados no desenvolvimento de plantas tolerantes à seca, através de técnicas de transferência genética. O fator de transcrição DREB1A interage especificamente com a região DRE estresse induzida e ativa um grande número de genes em resposta a esse estresse. A utilização do promotor *rd29A* contendo a região DRE e a região codante do fator de transcrição DREB1A tem demonstrado promover tolerância à seca em plantas transgênicas como tabaco, (Kasuga et al., 2004), trigo (Pellegrineschi, et al., 2002) e *A. thaliana*.(Kasuga et al., 1999). Plantas transgênicas de tabaco e trigo expressando o fator de transcrição DREB1A de *A.thaliana* sugere a conservação desses genes no reino vegetal. Assim, a superexpressão da proteína DREB1A apenas em condições de déficit hídrico utilizando promotores estresse-induzidos, demonstrar um importante potencial como estratégia no desenvolvimento de culturas mais tolerantes à seca em espécies de importância econômica como a soja.

Tabela1. Genes de *Arabidopsis thaliana* induzidos pelo fator de transcrição DREB1A.

| Gene | Categoria funcional ou similaridade | Publicação |
|--|--|--------------------------------------|
| <i>rd29A</i> | Proteínas LEA (proteína hidrofílica) | Kasuga et al., 1999 |
| <i>kin1</i> e <i>kin2/cor6.6</i> | Codifica proteína com estrutura similar a proteína anticongelamento rica em alanina produzida em alguns peixes. | Kasuga et al., 1999 |
| <i>cor15a</i> | Proteína presente no estroma de cloroplastos e aumenta a tolerância ao frio em protoplastos de folhas de <i>A. thaliana</i> | Kasuga et al., 1999 |
| <i>erd10</i> e <i>rd17/cor47</i> | Grupo 2 das proteínas LEA (proteína hidrofílica) | Kasuga et al., 1999 |
| <i>FL3-5A3, FL5-2I22, FL5-94</i> e <i>FL5-77</i> | Seqüência similar à provável proteína de aclimação ao frio (acesso nº AC006438), DC 1.2 homólogo (acesso nº X80342), <i>enolase</i> (acesso nº X58107), e peroxiredoxina TPX1 (acesso nº AF121355) | Seki et al., 2001 |
| <i>FL3-27</i> | Inibidor de proteinase (acesso nº Z21954) | Seki et al., 2001 |
| <i>erd4</i> | Proteína de membrana | Seki et al., 2001; Oono et al., 2003 |
| <i>erd13</i> | Enzima detoxificante | Oono et al., 2003 |
| <i>rd28</i> | Proteína de canal de água | Oono et al., 2003 |
| <i>rd20</i> | Sinalização | Oono et al., 2003 |
| <i>erd9</i> | Enzima detoxificante | Oono et al., 2003 |
| <i>erd7</i> | Proteína relacionada a senescência | Oono et al., 2003 |
| <i>At1g27730/STZ ZAT.10</i> | <i>C₂H₂ zinc finger DNA-binding protein</i> (fator de transcrição) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At5g04340</i> | <i>C₂H₂ zinc finger DNA-binding protein</i> (fator de transcrição) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g46768/RAP2.1</i> | Proteína ligada ao domínio AP2 | Murayama et al., 2004 |

| | | |
|--------------------------------|---|-----------------------|
| | (fator de transcrição) | |
| <i>At5g58670/ AtPlc1</i> | <i>Phosphatidylinositol-specific phospholipase</i> (PI metabolismo) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g21660/ AtGRP7</i> | <i>Glycine-rich RNA-binding protein</i> (RNA-binding protein) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g35300</i> | Proteína transportadora de açúcar (Transporte de proteínas) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g31360/ ADS2</i> | <i>Delta 9 desaturase</i> (Desaturase) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g09350/ AtGols3</i> | Galactinol sintase (metabolismo) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g23600</i> | Tirosina transaminase (metabolismo) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g33070/ Pdc1</i> | Piruvato descarboxilase-1 (metabolismo) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g02100</i> | <i>Gamma-thionins family</i> (Inibidor de protease) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g43510</i> | Inibidor Tripsina (Inibidor de protease) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g12470</i> | Inibidor de protease | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g12480</i> | Família LTP (Inibidor de protease) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g01470</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g16850</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g20440/ rd17/cor47</i> | Dehidrina (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g20450/ erd10</i> | Dehidrina (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g42530/ cor15b</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g42540/ cor15a</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At3g50970/ Xero2</i> | Dehidrina (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g15910</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At5g15960/ Kin1</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At5g15970/ kin2/ cor6.6</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |

| | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| <i>At5g52310/ rd29A/ lti78</i> | Proteínas LEA (Proteína hidrofílica) | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g17840/ erd7</i> | Proteína relacionada a senescência | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g29390</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g51090</i> | Proteína rica em prolina | Murayama et al., 2004 |
| <i>At1g54410</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g23120</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g28900</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At2g33830</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g14000</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g24960/ AtHVA22d</i> | Família AHVA22 | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g30650</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At4g38580/ ATFP6</i> | <i>Farmesylated protein</i> | Murayama et al., 2004 |
| <i>At5g17460</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |
| <i>At5g62350</i> | Proteína desconhecida | Murayama et al., 2004 |

2.2 Transformação genética de plantas

2.2.1 Métodos de transformação genética de plantas

Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética (Brasileiro et al., 1999). Atualmente, diversos métodos estão disponíveis e podem ser agrupados em duas categorias: transferência indireta e transferência direta de genes (Brasileiro et al., 1999; Trojanowska, 2002).

O método indireto baseia-se no uso de um vetor intermediário como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, para a inserção do DNA exógeno dentro da célula alvo.

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é um patógeno que tem seu ambiente no solo e possui a capacidade de infectar plantas, causando a doença denominada “galha da coroa”, por meio da transferência de um segmento de DNA (T-DNA) do seu plasmídio indutor (Ti) para a célula da planta (Paz et al., 2004). A expressão de genes presentes no T-DNA, os oncogenes, interfere na síntese de hormônios pela planta, levando a formação da galha ou tumor (Lacorte e Romano, 1998).

A base molecular da transformação via *Agrobacterium* em células vegetais é a transferência da região indutora de tumor (Ti) ou rizogênica (Ri), existente no plasmídio de *Agrobacterium* (Stanton B. Gelvin, 2003). O caráter trófico da relação bactéria-planta deve-se a genes presentes no T-DNA que, ao serem inseridos no genoma da planta, são transcritos e traduzidos como os genes vegetais. Tais genes codificam opinas que são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio favorecendo o crescimento de agrobactérias (Brasileiro et al., 1999).

A transferência do DNA (T-DNA) ocorre devido à atuação de proteínas localizadas no plasmídio, que são codificadas por genes encontrados na região *vir* do plasmídio e possuem um papel essencial no processo de transformação. As proteínas VirA e VirG atuam como um sinal sensorial do sistema regulatório genético. VirA é uma antena periplasmática sensível à presença de componentes fenólicos como acetoseringone, proveniente de lesões ou ferimentos no tecido de plantas. Coordenado com o transporte de monossacarídeos ChvE e na presença do componente fenólico apropriado e moléculas de açúcar, VirA se autofosforila e subsequente transfosforila a proteína VirG, que ajuda ativar ou aumentar o nível de transcrição dos demais genes *vir*, provavelmente por interação com a sequência *vir* -box que forma um componente de promotores de genes *vir*. (Brasileiro et al., 1999; Stanton B. Gelvin, 2003).

Uma vez estabelecido que os genes contidos no T-DNA não interferem no processo de transferência desse, da célula bacteriana para a célula vegetal, foram construídos vetores “desarmados” das funções oncogênicas para a manipulação de *Agrobacterium* no uso da engenharia genética (Brasileiro et al., 1999). Com isso, cientistas desenvolveram estratégias para introduzir genes exógenos na região do T-DNA através de dois procedimentos diferentes: inserção do gene exógeno, por meios indiretos no plasmídeo Ti, de forma que o gene fique disposto em *cis* aos genes *vir*, ou seja, no mesmo plasmídeo, ou a inserção do gene exógeno em uma região-T de um determinado plasmídeo (vetor binário), pois esse quando inserido em uma cepa de *Agrobacterium* desarmada, transfere o gene exógeno contido no vetor binário para a célula da planta devido a atuação em *trans* dos produtos gerados pelos genes *vir* (Stanton B. Gelvin, 2003).

Os métodos diretos não utilizam células bacterianas ou vírus como mediadoras, são baseados em métodos físicos ou químicos. Exemplos de métodos diretos podem ser citados, tais como: biobalística, eletroporação, transformação mediada por fibras de silicone, microinjeção (Trojanowska, 2002), polietilenoglicol (PEG) (Brasileiro et al., 1999).

A técnica de aceleração de partículas, também conhecida como biobalística (biológico e balístico), método “*gene gun*”, bombardeamento de microprojéteis, entre outros, foi desenvolvida e descrita primeiramente por Sanford et al. (1987). A técnica utiliza partículas revestidas com DNA exógeno em alta velocidade para atingir células ou tecidos alvo, e esses quando cultivados posteriormente *in vitro* e regenerados, podem originar plantas geneticamente modificadas (Aragão, 2002; Zárte e Yeoman, 2003).

As partículas utilizadas no processo podem ser de ouro ou tungstênio (Aragão, 2002; Zárte e Yeoman, 2003); de tamanho pequeno (0.5 a 5 μm), o suficiente para acelerar e ultrapassar a parede celular (Zárte e Yeoman, 2003), levando o DNA exógeno

presente na superfície da partícula para dentro da célula (Aragão, 2002; Zárate e Yeoman, 2003). O tipo apropriado de micropartículas varia em função do tamanho das células a serem transformadas, no geral, as micropartículas devem possuir um tamanho em torno de 1/10 do tamanho da célula-alvo. Para células de plantas, partículas com diâmetro em torno de 0,2 a 1,5 µm como, M10 Sylvania, são as mais indicadas (Lacorte et al., 1999).

Quando as partículas estão prontas para serem disparadas, macrocarreadores são empregados como suporte para acelerar as partículas. O macrocarreador é retido por uma tela de retenção e as partículas continuam até colidirem com o alvo. Uma tela de metal do tamanho específico fica situada entre o ponto da explosão e o alvo para assegurar que as partículas revestidas sejam espalhadas uniformemente, e para que haja uma colisão mais uniforme com o alvo. A penetração da partícula pode ser controlada alterando diversos parâmetros, isso inclui o tamanho das partículas, a distância entre o suporte da amostra e o alvo, a pressão aplicada para acelerar as partículas, ou a presença da tela usada para dispersar as partículas antes de chegarem ao alvo. Estes parâmetros podem ser utilizados para conseguir melhores condições de transformação (Lacorte et al., 1999; Zárate e Yeoman, 2003).

A onda de choque pode ser gerada por uma explosão química de pólvora seca, por uma descarga de gás hélio sob alta ou baixa pressão, pela vaporização de uma gota da água com alta voltagem e baixa capacitância ou baixa voltagem e alta capacitância, ou por uma descarga de ar comprimido. Sistemas que utilizam gás hélio sob uma descarga de alta pressão têm sido os mais utilizados (Lacorte et al., 1999; Aragón, 2000; Aragón, 2002).

Em algumas células as partículas atravessam a parede celular e as membranas celular e nuclear de uma maneira não letal, localizando-se aleatoriamente em organelas ou no núcleo celular (Lacorte et al., 1999; Aragón, 2000; Aragón, 2002). Em caso de expressão transiente, o DNA não é integrado no genoma e permanece no citoplasma da célula atingida e a expressão gênica pode ser detectada após 24 ou 72 horas (Lacorte et al.,

1999). Quando no interior da célula, o DNA se desassocia das micropartículas pela ação do líquido celular, e ocorre o processo de integração do DNA exógeno no genoma da célula atingida. Essa célula ao se dividir transmite o DNA inserido para outras células e tecidos chegando ao desenvolvimento completo de um organismo contendo o DNA exógeno (Yamashita et al., 1991).

Apesar da eficiência e a universalidade de utilização dessa técnica, o processo de biobalística requer sempre a otimização de vários parâmetros biológicos, relacionado à cultura do tecido, permitindo a regeneração da célula originalmente transformada em plantas e tecidos geneticamente modificados.

A região apical de eixos embrionários é um alvo utilizado no desenvolvimento dos sistemas baseados no bombardeamento de células meristemáticas, pois a técnica baseia-se na introdução do DNA exógeno em células meristemáticas presentes nessa região (Aragão, 2000; Aragão, 2002). Entretanto uma importante restrição no sistema de transformação baseado no disparo de partículas em tecido meristemático de eixos embrionários é a dificuldade de realizar uma eficiente seleção de células transformadas (Aragão et. al, 2002).

Diversos protocolos foram desenvolvidos para regeneração de culturas importantes, visando otimizar esse sistema. Assim, Aragão et al. (2000) desenvolveram um sistema para selecionar células meristemáticas geneticamente transformadas, pelo uso de um agente de seleção capaz de se translocar e concentrar na região do meristema apical da planta. Moléculas herbicidas como glifosato e as imidazolinonas atuam dessa forma e podem ser utilizadas em processo de seleção de células transformadas na região meristemática de tecidos transformados.

2.2.2 Plantas geneticamente modificadas tolerantes à seca

As plantas acumulam um número de compostos nitrogenados em respostas a estresse ambientais como aminoácidos, amônios e poliaminas. As poliaminas como putrescina, espermidina e espermina, são policações de baixo peso molecular presente em todos os organismos vivos. A diamina (putrescina) e as poliaminas (espermidina e espermina) estão presentes em inúmeras etapas do crescimento e diferenciação das plantas, como a germinação, divisão celular, diferenciação das folhas, flores e raízes, desenvolvimento da flor e fruto; senescência dos órgãos e outros (Galston e Kaur-Sawhney, 1995). Em vários tipos de estresse ambiental, principalmente o hídrico, verificou-se acúmulo desses compostos (Flores e Galston, 1982), principalmente em relação a putrescina (Aziz e Larher, 1995; Zhang et al., 1996; Aziz et al., 1997), todavia ainda não está claro em que circunstâncias esses compostos contribuem para a adaptação das plantas ao estresse (Aziz e Larher, 1995; Galston et al., 1997). A putrescina é o precursor na biossíntese de espermidina e espermina. Plantas transgênicas de arroz foram transformadas por *Agrobacterium tumefaciens*, para a expressão do gene *adc* de *Datura stramonium* que codifica a enzima arginina descarboxilase (*adc*). Essa enzima faz parte da via alternativa na síntese de putrescina; as plantas transformadas com essa enzima produziram altos níveis de putrescina sob condições de estresse, promovendo a síntese de espermidina e espermina que atuam na proteção contra o déficit hídrico, demonstrando que a manipulação na biossíntese de poliaminas pode produzir tolerância à seca (Capell et al., 2004).

Li et al. (2005), combinam o elemento em resposta à desidratação (DRE) com o elemento específico de células guardas (GCSE) para construir um novo promotor, DGP1. Análises histoquímicas em plantas transgênicas de tabaco carregando o gene da enzima beta glucuronidase (GUS) fusionado ao promotor DGP1, demonstrou a atividade de GUS altamente induzida em tratamentos de seca e restrita a células guardas. Isso demonstra

que o promotor DGP1 pode dirigir a expressão de genes alvos em células guardas quando as plantas estão sujeitas ao déficit hídrico e que é possível desenvolver estratégias moleculares em plantas para o controle de abertura e fechamento dos estômatos.

Betaína é um importante osmoprotetor, sintetizado por muitas plantas em resposta a estresse abiótico. A via biossintética mais conhecida de betaína inclui duas etapas de oxidação de colina: colina \rightarrow betaína aldeído \rightarrow betaína. A primeira etapa é catalizada por colina monooxigenase (CMO) em plantas e colina oxidase em algumas bactérias. A segunda etapa é catalizada por dehidrogenase aldeído betaína dependente de NAD^+ , em todos os organismos, entretanto, em algumas bactérias CDH e colina oxidase também catalizam a segunda etapa.

Recentemente, foi descoberta uma via biossintética de betaína em cianobactéria *Aphanothece halophytica*, catalisada por duas enzimas *N*-metiltransferase nomeadas *A. halophytica* glicina sarcosina metiltransferase (ApGSMT) e *A. halophytica* dimetilglicina metiltransferase (ApDMT). A enzima ApGSMT catalisa as reações de metilação de glicina para sarcosina e sarcosina para dimetilglicina. Enquanto a enzima ApDMT catalisa a metilação específica de dimetilglicina para betaina.

Waditee et al. (2005) verificaram o papel dessas enzimas de *A. halophytica* na síntese de betaina em *A. thaliana* e verificou que plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando os genes *N*-metiltransferase pelo uso do promotor *35SCaMV*, aumentaram a tolerância à salinidade durante o estágio reprodutivo e acumularam altos níveis de betaina em raízes, caules, folhas e flores em condições de déficit hídrico. A eficiência apresentada pelos genes *N*-metiltransferase, pode ser útil no desenvolvimento de tolerância à estresse abiótico em culturas.

Novillo et al. (2004) promoveram o silenciamento do gene *CBF2/DREB1C* em *A. thaliana*, para verificar a função desse gene em resposta ao frio, seca e salinidade. Em

tratamentos de seca e salinidade, os genes *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* foram mais expressos em plantas modificadas do que em plantas selvagens. A expressão dos genes *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* mostrou preceder a expressão de *CBF2/DREB1C* em tratamento de frio. Os genes *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* tiveram um padrão de expressão similar e foram expressos dentro de 15 minutos após indução, atingindo o máximo em 90 minutos e declinando em seguida. No entanto, o gene *CBF2/DREB1C*, teve uma taxa de acúmulo lenta, atingindo um nível máximo depois de duas horas e meia. Análises de *microarray* demonstraram que sob condições normais os níveis de transcritos de *CBF2/DREB1C* foram de 5 a 8 vezes mais que os níveis de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B*. A análise dos dados em conjunto, permitiu propor um modelo hipotético para o modo de ação de *CBF2/DREB1C* em resposta ao frio. Sob condições normais os níveis de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* seriam reprimidos por *CBF2/DREB1C*. Em situações de baixa temperatura, a ativação de diferentes reguladores ou específicos como ICE1 (*Inducer of CBF Expression*), induziria rapidamente a expressão de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* fugindo da repressão promovida por *CBF2/DREB1C*. Uma vez *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* atingindo certos níveis de expressão, *CBF2/DREB1C* seria induzido e promoveria a supressão de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* assim como, a ativação de outros genes envolvidos na resposta de aclimação ao frio.

Plantas de tabaco transformadas com as construções *rd29: DREB1A* e *35S: DREB1A* demonstraram variações em resposta ao crescimento. As plantas *35S: DREB1A* tiveram o crescimento afetado, apresentando o tamanho altamente reduzido. No entanto, em plantas *rd29: DREB1A* ocorreu apenas uma leve redução no tamanho, demonstrando que há uma relação entre os níveis de expressão do gene *DREB1A* e o crescimento em plantas transgênicas. Ambas as plantas transgênicas *rd29: DREB1A* e *35S: DREB1A* apresentaram alta tolerância ao frio e à seca quando comparadas às plantas controles (Kasuga et al., 2004).

Plantas de tomate transformadas com a construção 35S: CBF1/DREB1B também apresentaram redução no crescimento, mas o tratamento com ácido giberélico reverteu o retardo ao crescimento e aumentou o crescimento em plantas transgênicas de tomate, indicando que a super expressão do gene DREB pode interferir em processos de desenvolvimento regulados por fitohormônios como ácido giberélico. Sob condições de déficit hídrico as plantas transgênicas de tomate mostraram maior tolerância à seca do que plantas selvagens (Hsieh et al., 2002).

Embriões de trigo transformados com a mesma construção contendo o DNAC *DREB1A* dirigido pelo promotor *rd29* através da técnica de biobalística, apresentaram folhas com turgor reduzido, após 15 dias de déficit hídrico. Entretanto, todas as plantas não transformadas, utilizadas como controles não foram tolerantes ao déficit hídrico e morreram, demonstrando que a construção utilizada é eficiente no processo de tolerância à seca, pois o aumento da expressão da proteína DREB sob condições de déficit hídrico induz a expressão de vários genes de defesa de estruturas celulares como *rd29A*, *cor15A*, *Kin1*, *Kin2*, *rd17*, *erd13*, *rd28*, *erd4*, *rd20*, *erd9*, *erd7* e *rd22* (Pellegrineschi, et al., 2002; Oono et al., 2003; Bray et al., 2003).

2.2.3 Principais métodos de transformação genética em soja

A transformação genética de soja tem sido um grande desafio, devido à variabilidade genética de cultivares e as diferenças nas respostas à cultura *in vitro* e procedimentos de transformação (Droste et al., 2002). As eficiências de transformação que são reportadas nessa leguminosa são geralmente baixas e, como outras culturas de interesse, os protocolos criados são normalmente genótipos específicos (Somers, 2003).

Existem dois métodos que têm sido bem sucedidos em transformação de soja: O primeiro é o método de biobalística em tecidos embriogênicos (Droste et al., 2002) e o segundo é a transformação de tecidos cotiledonares por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Olhoft e Somers, 2001). Apesar de os dois métodos serem viáveis, os mesmos possuem algumas limitações.

Plantas transgênicas derivadas do bombardeamento de micropartículas tendem a possuir integração de múltiplas cópias do transgene em seu genoma ou a fragmentação do DNA exógeno antes que isso aconteça. Existem relatos em soja, de eventos de inserção de até 100 cópias de um transgene (Reddy et al., 2003). A interação entre múltiplas cópias pode causar silenciamento gênico e dificultar o desenvolvimento de variedades comerciais geneticamente estáveis.

Como vantagem, pode-se citar seu procedimento rápido e simples além da facilitação da transformação de tecidos totipotentes como pólen, embriões, meristemas e culturas de células além de ser um método viável para a transformação de organelas (Sanford, 1990).

No caso de transformação por *Agrobacterium*, a infecção e regeneração dos tecidos são dependentes da cultivar utilizada, e requer técnicos capacitados para uma melhor reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, essa técnica tem a vantagem de inserir um número de cópias menor que os métodos diretos de transformação (Paz et al., 2004).

A maior limitação na produção de soja geneticamente modificada utilizando transformação por *Agrobacterium* é a baixa frequência de transferência do T-DNA da bactéria para tecidos de soja, mas vários laboratórios sugerem que linhagens desta bactéria que são menos eficientes em transferir o T-DNA podem ser mais eficientes em introduzir inserções de cópias únicas no genoma (Gelvin, 2003). Entretanto, mesmo que normalmente a transformação por *Agrobacterium* resulte em um baixo número de inserção de cópias do

transgene, é comum encontrar cópias em *tandem* de T-DNAs integrados em um único locus, o que torna difícil a obtenção de uma planta com uma única cópia do transgene (Kohli et al., 1999).

O desenvolvimento de um método de transformação efetivo por *Agrobacterium* depende do genótipo, vigor do explante, vetor, sistema de seleção, condições de cultura e cepa da bactéria a ser utilizada para a transformação (Zhang et al., 2000). Relatos indicam que o genótipo da soja contribui para variação a suscetibilidade a *Agrobacterium* e a regeneração em culturas de tecidos (Meurer et al., 1998; Donaldson e Simmonds, 2000). A falta de um procedimento de regeneração eficiente que inicie uma rápida proliferação de origem unicelular no tecido e o uso de técnicas que causam injúrias maiores ao invés de menores no tecido alvo são obstáculos para a transformação estável de soja por *Agrobacterium* (Santarém et al., 1998).

O aumento da eficiência de transformação tanto para biobalística quanto para *Agrobacterium* em soja, só poderá ser alcançado por otimizações mais aprofundadas do sistema de seleção para ambas as técnicas, aumento da interação explante-patógeno, no caso de *Agrobacterium* e aprimoramento das condições de cultura para promover uma melhor regeneração e recuperação das plantas transformadas no caso de biobalística (Paz et al., 2004).

2.2.4 Genes marcadores de seleção em plantas

Genes marcadores de seleção são introduzidos no genoma da planta para expressar uma proteína com atividade enzimática, permitindo distinguir células transformadas de não transformadas (Brasileiro e Dusi, 1999).

O uso de genes marcadores no processo de transformação visa dar às células transformadas uma vantagem seletiva, permitindo que elas cresçam rápido e melhor, eliminando assim as células não transformadas. A expressão de genes marcadores pode ser facilmente distinguida em qualquer atividade endógena em tecidos vegetais e permite diferenciar o fenótipo de tecidos transformados de não transformados. Portanto, a probabilidade para reconhecer células transformadas na presença de um agente seletivo é maior do que na ausência, especialmente porque a taxa de transformação é normalmente baixa. Em geral esses genes são inseridos na planta, separadamente ou ligados ao gene de interesse no mesmo vetor de transformação (Brasileiro e Aragão, 2001). De acordo com Aragão et al. (1996), a frequência de co-transformação é próxima a 100% quando os genes estão ligados e 50% quando eles estão separados.

Os genes utilizados como marcadores de seleção podem ser divididos em três categorias de acordo com o modo de ação: genes que conferem resistência a antibióticos, genes que conferem resistência a herbicidas e genes marcadores para seleção positiva.

Dentre os genes que conferem resistência a antibióticos estão o *npt II* (ou *neo*) e o *hpt* (ou *aph IV*).

O gene *npt II* foi isolado do transposon Tn 5 de *Escherichia coli* e codifica para uma enzima chamada neomicina fosfotransferase II (Pat: 2.7.1.95), também conhecida como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase II (Ritchie e Hodges, 1993). A enzima NPT II atua transferindo o grupamento γ -fosfato do ATP para um grupo 3-hidroxil na porção amino hexose dos antibióticos aminoglicosilados, como canamicinina, neomicina, geneticina e paromomicina, que são assim detoxificados por fosforilação. Desta forma, não ocorre a ligação do antibiótico à subunidade ribossomal, permitindo que ocorra a síntese de proteínas (Norelli e Aldwinckle, 1993), pois esses antibióticos quando ativos, inibem a síntese de proteínas em células procariotas, ligando-se à subunidade 30S e 50S dos ribossomos,

impedindo o início da tradução. Em células vegetais, esses antibióticos exercem seu efeito nas mitocôndrias e cloroplastos, agindo da mesma maneira para evitar a síntese de proteínas. Assim, na presença do antibiótico, o tecido da planta irá apresentar clorose causada pela falta de síntese de clorofila, e inibição de seu crescimento (Brasileiro, 1999).

O gene *hpt* codifica para a enzima higromicina fosfotransferase (Pat: 2.7.1.119), também conhecida como aminoglicosídeo 4'-fosfotransferase. Este gene foi isolado de *Escherichia coli* e tem sua ação conferindo resistência ao antibiótico higromicina B (Guimarães e Santana, 2003). O antibiótico higromicina, quando ativo, ocupa o sítio de ligação ribossomal do fator de alongamento 2 (EF-2) em células procarióticas. Como consequência, a alongamento da cadeia polipeptídica é inibida e a síntese de proteína interrompida causando os mesmos sintomas que os descritos para antibióticos aminoglicosídeos. A enzima codificada pelo gene *hpt* catalisa a fosforilação do grupo hidroxil no antibiótico higromicina sendo inativado (Brasileiro e Aragão, 2001).

Dentre as estratégias básicas já utilizadas na manipulação de resistência a herbicidas em plantas transgênicas está a expressão de genes mutados que codificam para enzimas alvo modificadas no sítio de ligação do herbicida, o que reduz a capacidade de ligação do herbicida e consequentemente inibição da enzima. Como exemplos, podem ser citados a resistência aos herbicidas triazinas (que inibem a fotossíntese), imidazolinonas (que inibem a atividade da enzima AHAS, a qual cataliza a etapa inicial na biossíntese de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina) e glifosato (que inibe atividade da enzima EPSPS importante na biossíntese de aminoácidos) (Brasileiro, 1998).

O gene *ahas* (ou *csr1*) codifica para uma forma alterada da enzima de sintase do ácido acetohidroxil (AHAS) também conhecida como acetolactato sintase (ALS). Essa construção possui uma mutação na posição 653 pares de base (pb) que resulta na

substituição de uma serina por uma asparagina, produzindo uma enzima AHAS alterada não reconhecida pelos herbicidas da classe das imidazolinonas (Aragão e Brasileiro, 2002).

Células meristemáticas transformadas com esse gene podem ser selecionadas pelo uso de herbicida como Imazapyr. O processo é baseado na translocação sistêmica de molécula seletiva para regiões meristemáticas e a inativação da enzima AHAS endógena. Como o agente seletivo acaba se concentrando no ápice meristemático, as células não transformadas são mortas, favorecendo a sobrevivência das células transformadas que se desenvolvem em plantas.

Esse sistema de marcador de seleção, combinado com um protocolo adequado, resulta em um aumento significativo na recuperação de embriões bombardeados (de 4% para 20%, o número de plantas transgênicas relatadas, para o número de embriões bombardeados) comparado com o protocolo padrão de transformação de soja (Aragão et al., 2000).

Os marcadores de seleção positiva agem de forma diferente, dando vantagens seletivas às células transformadas, não matando as células não transformadas. Neste caso, o gene marcador confere as células transformadas à capacidade de metabolizar alguns compostos que não são casualmente metabolizados pela planta. A adição de um novo composto ao meio de cultura, como uma fonte de nutriente durante o processo de regeneração, permite o crescimento e diferenciação normal das células transformadas, enquanto as não transformadas não serão capazes de crescer e regenerar novas plantas (Brasileiro e Aragón, 2001).

Dentre os genes de seleção que fazem parte desse tipo de seleção está o gene *manA*. O gene *man* codifica para uma enzima chamada fosfomanose isomerase (Patente: EC5. 3.1.8.) isolado de *Escherichia coli*. Na presença do substrato manose em células transformadas, essa enzima converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato que pode ser

imediatamente incorporado na via metabólica da planta. Desta forma, a manose pode ser usada como uma fonte de carboidrato para as células transformadas o que normalmente não ocorre em plantas (Joersbo et al., 1998).

O gene *gus* codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) (Pat: EC 3.2.1.31) e foi também isolado de *Escherichia coli*. Neste sistema, o agente seletivo é um glucoronídeo derivado de benzilaldenina (benzilaldeninaN-3-glucoronídeo), uma forma inativa do hormônio citocinina em plantas. Este glucoronídeo presente no meio de seleção é hidrolisado pela enzima GUS presente em células transformadas com esse gene, liberando a forma ativa da citocinina no meio. Essa citocinina é um estimulador para a regeneração de células transformadas (Brasileiro e Aragão, 2001). Uma outra forma de utilização do gene GUS como um marcador de seleção, é a detecção da atividade enzimática em tecidos vegetais através de ensaio histoquímico. Pelo fato da maioria das plantas não apresentarem atividade endógena de GUS significativa, a atividade de GUS em tecidos não transgênicos (falsos positivos) pode ser decorrente da presença de contaminações endofíticas (bactérias ou fungos). O ensaio histoquímico é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-gluc) pela β -glucuronidase. O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul. Esse ensaio histoquímico é muito utilizados em estudos de regulação de expressão gênica em relação à especificidade do tecido, no isolamento de promotores, na identificação de plantas ou tecidos transgênicos e na otimização das condições de transferência de genes.

O uso de um bom marcador de seleção é fundamental para uma eficiente recuperação *in vitro* de plantas transgênicas. O sucesso de um determinado marcador de seleção depende das características do agente de seleção, do gene marcador de seleção (gene de resistência) e do material vegetal utilizado (Brasileiro,1998).

2.3. Métodos de análise molecular de plantas geneticamente modificadas

Organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser identificados por detecção do material genético inserido em nível de DNA, RNAm, proteína, metabólito ou o respectivo fenótipo (Brasileiro e Carneiro, 1998; Lubeck, 2002), através de várias técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ensaio imunológico ou bioensaio com herbicidas. (Lubeck, 2002).

O método de caracterização fenotípica, conhecido como bioensaio com herbicidas permite testar a presença ou ausência de resistência a alguns herbicidas. Esse teste consiste na germinação de sementes em meio contendo o herbicida específico, onde sementes transgênicas e não transgênicas mostram características distintas. As sementes positivas devem ser expostas a testes subsequentes para confirmação. Os testes de bioensaio com herbicidas são baratos e úteis como testes iniciais (Lubeck, 2002).

Imunoensaios denominados ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Engvall e Perlman, 1971) são métodos de detecção e quantificação das proteínas (exógenas) expressas após a introdução do respectivo gene que a codifica. O principal componente de um imunoensaio é um anticorpo com especificidade elevada a uma molécula alvo (proteína exógena). Os imunoensaios podem ser altamente específicos e as amostras necessitam apenas de uma simples preparação antes de serem analisadas (Aragão e Ribeiro, 1998; Lubeck, 2002).

A técnica de PCR, no entanto, oferece uma análise mais precisa em estudos envolvendo OGMs. Ensaios baseados em PCR requerem etapas que influenciam a confiabilidade e a sensibilidade do método, como o tipo de amostra e a preparação da mesma (Brown et al., 1993). Cada etapa do PCR deve ser otimizada a fim de garantir ao método a alta precisão que possui. A extração de DNA da amostra deve possuir um rendimento máximo

(~100%), evitando a degradação do DNA e com a remoção dos contaminantes químicos que possam inibir a amplificação por PCR. Além disso, métodos de análise baseados em PCR devem incluir controles e padrões apropriados que facilitam a verificação de cada análise e asseguram que o método está otimizado, promovendo desse modo confiabilidade dos resultados obtidos (Gama, 1998; Lubeck, et al., 2002).

Uma outra análise importante em OGMs, é a detecção do número de cópias do transgene inserido na planta. Essa análise é essencial na identificação de eventos com baixo número de cópias que serão os mais indicados para uso como evento “elite” em programas de melhoramento. A detecção do número de cópias pode ser realizada através de técnicas específicas como *Southern blot* e PCR em tempo real.

A técnica de *Southern blot*, descrita por Edwin M. *Southern* em 1975, detecta fragmentos de DNA específicos, em amostras de composição complexa, como DNAs genômicos, permitindo-se analisar seqüências de DNAs exógenos que são inseridos e integrados no genoma da planta pelos métodos de transformação genética. O método consiste na digestão do DNA por uma ou mais enzimas de restrição, separação do produto obtido por eletroforese em gel de agarose, transferência do DNA desnaturado para uma membrana de náilon ou nitrocelulose, fixação do DNA à membrana e hibridização com uma sonda contendo a seqüência de interesse (Romano, 1998).

Já a técnica de PCR em tempo real apesar de prática e eficiente requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e coleta da emissão e um computador com um *software* para a aquisição dos dados (Novais e Alves, 2004). A técnica de PCR em tempo real, baseia-se na detecção e quantificação de compostos fluorescentes, que emitem um sinal de luz que aumenta na proporção direta a quantidade do produto de PCR em uma reação, permitindo monitorar a quantidade de produto gerado durante todos os ciclos (Novais e Alves, 2004;

Ambion, 2005). O ponto em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, denominado de *Cycle Threshold* (C_t), permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (Dorak, 2004). Dessa forma, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam à quantidade de produto amplificado em tempo real (*Applied Biosystem*, 2005).

Existem algumas variações nos métodos de emissão da fluorescência em PCR em tempo real e diferentes fluoróforos estão disponíveis no mercado e podem ser utilizados de acordo com cada ensaio específico, entretanto, os compostos fluorescentes mais utilizados são *TaqMan*[®] e *SYBR*[®] *Green*. No método que se utiliza uma sonda interna como *TaqMan*[®] (patente da empresa *Applied Biosystems*), a atividade exonuclease 5'-3' da enzima *Taq polimerase* cliva a sonda quando a mesma está hibridizada a seqüência de DNA de interesse durante a fase de extensão do PCR. A sonda *TaqMan*[®], que é duplamente marcada, apresenta de um lado um fluoróforo *reporter* (molécula que emite fluorescência), e do outro uma molécula *quencher* que captura a fluorescência do *reporter* enquanto a sonda estiver intacta. Quando ocorre a separação das moléculas pela atividade exonuclease da enzima *Taq polimerase* sob a sonda, ocorre um aumento na emissão da fluorescência pelo *reporter*, o qual não é mais capturado pelo *quencher*, permitindo assim, a leitura pelo aparelho. Esse processo ocorre em cada ciclo e não interfere no acúmulo exponencial do produto de PCR (Giulietti et al., 2001).

Outro método que oferece facilidade, baixo custo e sensibilidade, é o método que utiliza moléculas fluorogênicas, como o *SYBR*[®] *Green*. Esse fluoróforo se liga entre a dupla fita de DNA, e sob excitação da luz emitida pelo sistema *laser* emite uma fluorescência verde (Novais a Alves, 2004). A detecção da fluorescência ocorre por um sistema ótico durante a fase de extensão de cada ciclo e permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (Vizthum et al., 1999), o resultado é um aumento na intensidade de fluorescência proporcional a quantidade do produto de PCR produzido. A

desvantagem desse método é que a molécula pode se ligar a qualquer fita dupla de DNA na reação, como dímero de *primers* ou *amplicons* inespecíficos, podendo superestimar o produto final (Ambion, 2004; Novais e Alves, 2004). Assim, para diminuir ou evitar esse problema é necessário otimizar o máximo a reação de PCR.

A quantificação dos valores absolutos de DNA na determinação do número de cópias do transgene via PCR em tempo real, é então determinada pela geração de uma curva padrão externa com amostras de concentração conhecida que posteriormente é relacionanda aos valores de fluorescência da amostra de interesse (Schmidt e Parrott, 2001; *Applied Biosystem*, 2004). DNAs plasmidiais e transcritos e cDNAs são comumente utilizados para preparar padrões absolutos na confecção da curva padrão. A concentração é estimada em um valor de absorvância de 260 nanômetros e o número de cópias é convertido utilizando o peso molecular do DNA ou o RNA (*Applied Biosystem*, 2004).

Para se detectar os níveis de expressão com PCR em tempo real em ensaio de quantificação relativa se faz a PCR tanto nas amostras experimentais quanto nas de referência (controle endógeno). Os valores relativos gerados a partir da abundância de cada amostra experimental são extrapolados a partir da curva padrão gerada por uma amostra de referência. As diferenças relativas entre as quantidades de RNAm entre as amostras são precisas. Quando se analisa várias amostras, uma amostra é tipicamente designada como o “calibrador”, e os níveis de expressão relativo as outras amostras são expressas relativamente à amostra “calibradora” (Ambion, 2004).

Além da PCR em tempo real, a análise dos níveis de expressão de um gene exógeno pode ser realizada por técnicas como *Northern blotting*, *Ribonuclease Protection Assays* (RPA) (Alwine et al., 1977), *Microarray* (microarranjos de DNA) (Eisen e Brown, 1999) e *Differential Display* (DD) (Matz & Lukyanov, 1998; Martin & Pardee, 1999).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

- Obtenção de plantas de soja geneticamente modificadas para tolerância à seca.

3.2. Objetivos específicos:

- Transformação de embriões de soja com a construção *rd29A:DREB1A* e *rd29A:GUS* pela técnica de biobalística;
- Obtenção de plantas geneticamente modificadas com a construção *rd29A:DREB1A* e *rd29A:GUS*;
- Avaliação da indução do promotor *rd29A* através da expressão transiente em embriões de soja e expressão estável em plantas de soja, ambos transformados com a construção *rd29A:GUS*;
- Avaliação da estabilidade dos eventos gerados com o cassete de expressão *rd29A:DREB1A*;
- Quantificação dos níveis de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A*, pela técnica de PCR em tempo real em plantas de soja geneticamente modificada com o cassete de expressão *rd29A: DREB1A*;

4. Artigo

4.1 Transformação Genética em Soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *rd29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca.

Magda Aparecida Beneventi

Artigo a ser submetido à revista: *Plant Cell Physiology*

Resumo

A soja é um dos principais produtos da agricultura brasileira e move a economia nacional, participando com pelo menos 16% do PIB do país. Entretanto, a ocorrência de estresses abióticos como a seca tem afetado gravemente a cultura promovendo perdas acentuadas. A resposta à seca em plantas é regulada por um complexo de genes, que gera uma variedade de mecanismos fisiológicos e moleculares de tolerância. O conhecimento cada vez maior desses mecanismos e o uso da engenharia genética, através de técnicas de transformação para a introdução de genes, têm permitido o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com maior tolerância à seca. A proteína DREB1A (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*) de *Arabidopsis thaliana* é um fator de transcrição responsável pela ativação de uma série de genes envolvidos na defesa celular contra a desidratação, que ocorre quando plantas são submetidas à seca, frio e/ou salinidade. A inserção do vetor de expressão contendo a proteína DREB1A e o promotor *rd29A*, estresse-induzido, tem permitido o aumento da tolerância à seca em várias espécies como arroz, trigo, tabaco e *A. thaliana*. No presente trabalho, os cassetes de expressão *rd29A:DREB1A* e *rd29A:GUS* foram introduzidos em soja pela técnica de biobalística, com uma eficiência inicial de 1,8%. Em análises histoquímicas com GUS e com PCR em tempo real, foi possível verificar a indução do promotor *rd29A* em soja, assim como, o conseqüente aumento no nível de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* em condições de déficit hídrico. O promotor *rd29A* de *A.thaliana* demonstrou ser estresse-induzido em soja, promovendo a expressão de *AtDREB1A*. Também foi possível observar a estabilidade da integração no genoma de soja em plantas da primeira geração positivas para a presença de *AtDREB1A*. Entretanto, análises agronômicas sobre o aumento da tolerância ao déficit hídrico em soja estão sendo iniciadas.

Palavras-chave: Seca, fator de transcrição, expressão gênica, biobalística, PCR em tempo real.

Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é um dos principais produtos da economia brasileira, movimentando cerca de US\$ 50 bilhões, ao longo da cadeia produtiva e participando com pelo menos 16% do PIB do país. Entretanto, apesar de toda a tecnologia utilizada na cultura, a ocorrência de estresses abióticos como a seca afeta gravemente o desenvolvimento das plantas promovendo perdas acentuadas na produtividade (Embrapa, 2004; Conab, 2005).

Em resposta ao déficit hídrico as plantas desencadeiam um complexo de mecanismos de respostas em vários níveis, do molecular ao agrônômico (Bray, 1993; Kasuga et al., 1999). Em nível molecular, a expressão de uma série de genes tem sido demonstrada em resposta ao déficit hídrico. O produto desses genes pode ser classificado basicamente dentro de dois grupos: aqueles que atuam diretamente na proteção celular e aqueles que regulam a expressão e os sinais de transdução em resposta ao estresse (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Wang et al., 2003; Maruyama et al., 2004).

Uma seqüência conservada A/GCCGAC nomeada DRE (*Dehydration Responsive Element*) tem sido identificada na região promotora atuando como elemento de regulação *cis*-atuante na expressão de vários genes em resposta à seca, alta salinidade e frio (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994; Maruyama et al., 2004). A família de fatores de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) interage com a região DRE nos instantes iniciais da percepção do déficit hídrico controlando a expressão de vários genes como: *rd29A*, *cor15A*, *Kin1*, *Kin2*, *rd17*, *erd13*, *rd28*, *erd4*, *rd20*, *erd9*, *erd7* e *rd22*, os quais codificam proteínas que podem atuar como proteínas protetoras de estruturas celulares ou fatores de transcrição envolvidos na ativação de outros genes (Liu, et al., 1998; Gilmour, et al., 1998; Oono et al., 2003).

A utilização de um promotor contendo a região DRE regulando a expressão da região codante do fator de transcrição DREB tem demonstrado promover tolerância à seca e crescimento normal em plantas transgênicas quando comparado com o uso de expressão constitutiva do promotor *35SCamV* (Kasuga et al., 1999; Hsieh et al., 2002; Kasuga et al., 2004) em plantas transgênicas de tabaco, (Kasuga et al., 2004), trigo (Pellegrineschi, et al., 2002) e *Arabidopsis thaliana* (Kasuga et al., 1999). A introdução da construção *rd29A:DREB1A* em diferentes espécies tem demonstrado que a super expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* pode ser uma estratégia importante no desenvolvimento de culturas agronomicamente importantes como a soja.

O presente trabalho teve por objetivo introduzir em soja o cassete de expressão *rd29A:DREB1A*, contendo o elemento da região promotora do gene *rd29A* que é regulado em condições de dessecação celular (Hsieh et al., 2002; Kasuga et al., 2004) e a região codante do fator de transcrição *DREB1A* (Liu et. al, 1998; Kasuga et. al, 2004), ambos obtidos de *A. thaliana*, e avaliar a indução do promotor *rd29A* em soja e o conseqüente aumento no nível de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* durante condições de déficit hídrico pela técnica de PCR em tempo real. Também foram geradas plantas com o cassete de expressão *rd29A:GUS* (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K., 1993), para avaliar a eficiência de indução do promotor *rd29A* através da expressão transiente em embriões e expressão estável em plantas.

Materiais e Métodos

Construções utilizadas

Os plasmídios contendo as construções gênicas (*rd29A:DREB1A* e *rd29A:GUS*) com o promotor estresse-induzido *rd29A* (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Sinozaki, K., 1993 e Yamaguchi-Shinozaki, K. e Sinozaki, K., 1994) utilizados na geração de plantas tolerantes á seca, foram obtidos pelo acordo entre as empresas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS).

A construção *rd29A:DREB1A* inserida no plasmídio pBIG (Becker, 1990), contém o promotor estresse induzido *rd29A* de *A. thaliana* que possui uma seqüência conservada de 9pb (TACCGACAT) (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Sinozaki, K., 1999), nomeada DRE, essencial na regulação da expressão gênica sob condições de estresses como seca, baixa temperatura e salinidade. Esse promotor ligado ao cDNA DREB1A também de *A. thaliana*, codifica a proteína DREB1A que interage especificamente com à região DRE, aumentando a expressão de genes alvos envolvidos no processo de tolerância à seca somente em períodos de déficit hídrico e como terminador foi utilizado o NOS-T. Já o plasmídio pBI (Becker, 1990) com a construção *rd29A:GUS* possui o promotor *rd29A*, ligado a região codante do gene *gusA* de *Escherichia coli*, que codifica para a enzima β -glucuronidase (GUS), uma hidrolase que cliva o substrato 5-bromo4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (*X-gluc*). O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul.

A introdução dos cassetes foi feita em co-transformação com o plasmídio pAC 321 que contém o gene *ahas* de *A. thaliana*, com uma mutação na posição 653,

resultando em uma substituição dos aminoácidos serina por asparagina, conferindo resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas, que inibe a atividade enzimática da sintase acetohidroxiácida, a qual catalisa o passo inicial na biossíntese de isoleucina, leucina e valina, aminoácidos essenciais para a planta (Aragão et al., 2000, Aragão et al., 2002).

Para a multiplicação e estoque, esses plasmídeos foram inseridos em *E. coli* (cepa DH5 α), segundo o protocolo de Miller e Nickoloff (1995) e eletroporador *Micro pulser*, *Bio-Rad*. A purificação plasmidial foi realizada em larga escala utilizando-se o Kit Wizard® *Plus Maxipreps DNA Purification System* (*Promega Corporation, Madison, Wi, USA cat. A.7270*).

Obtenção das plantas transgênicas por biobalística

Os disparos foram efetuados na região meristemática de embriões provenientes de sementes da cultivar BR-16 sensível à seca (Oya et al., 2004) por co-transformação, com os plasmídios pBIG *rd29A:DREB1A*/ pAC321 e pBI *rd29A:GUS*/ pAC321, utilizando o protocolo desenvolvido por Aragão et al. (2002), com algumas alterações.

As sementes foram primeiramente esterilizadas em etanol 70% por 10 minutos, seguida por imersão em hipoclorito de sódio 50% por vinte minutos, e então lavadas três vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar, permanecendo imersas em água destilada por um período de aproximadamente 16 horas.

As sementes foram então incisadas para a retirada dos embriões com o auxílio de pinças e bisturis estéreis, sendo armazenadas em placa de Petri com água destilada para evitar a dessecação. Em seguida, os primórdios foliares foram retirados com auxílio de

microscópio estereoscópio modelo SQZ-DS4-BI (*Tecnival*), para a exposição da região de meristema apical. Posteriormente, os embriões foram secos sob exposição ao ambiente em papel de filtro em câmara de fluxo laminar, e posicionados em placas de Petri, contendo meio MS (*Murashige Skoog Basal Medium Salt, Murashige & Skoog 1962*), 3% de sacarose e 0,8% de *phytagel* e pH 5, 7, dispostos na linha de um círculo de 16mm de diâmetro centralizado a placa (zona de morte), tendo a região do meristema apical direcionada para cima.

As construções de DNA foram precipitadas sob micropartículas de tungstênio com o auxílio de CaCl_2 e espermidina e a introdução das construções de interesse ocorreram pelo uso do acelerador de partículas desenvolvido no Brasil.

Após a co-transformação com os genes de interesse, os embriões foram transferidos para placas contendo meio MS suplementado com benzilaminopurina (BAP – 5 mg/mL), 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH 5,7, onde permaneceram aproximadamente 18 horas ao abrigo da luz a 28°C para a indução ao multibrotamento. Os embriões foram então transferidos para copo plástico contendo meio seletivo com, MS, 3% de sacarose, 0,15 μM de herbicida Imazapyr, 0, 8% de agar e, vitamina B₅, pH 5,7, sendo 7 embriões em cada copo, os quais foram mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 28°C, com 16 horas de fotoperíodo e luminosidade de 50 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ e umidade relativa acima de 80% por aproximadamente 45 dias.

Após esse período foram transferidos dois embriões multibrotados por copo contendo areia:vermiculita (1:1) autoclavadas e umidecidas com solução nutritiva e cobertos com sacos plásticos para aclimação. Os embriões multibrotados foram irrigados com solução nutritiva a cada sete dias e mantidos por mais 28 dias em câmara climatizada, até a transferência para casa de vegetação. Após esse período de 28 dias, foram transferidos para casa de vegetação em vasos contendo uma mistura de terra e areia esterilizada (5:3), cobertos com saco plástico durante sete dias para aclimação, sendo substituído por saco plástico

furado por mais cinco dias. Após esse período de aclimação os plásticos foram então retirados para o desenvolvimento normal das plantas até o início das análises moleculares para a identificação de plantas positivas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Durante o período em casa-de-vegetação foi mantida irrigação por gotejamento três vezes ao dia por cinco minutos e temperatura de aproximadamente 28°C.

Análises de PCR

Para as análises de PCR em plantas transformadas extraiu-se DNA de discos foliares de acordo com o protocolo estabelecido por Edwards et al. (1991). Para a confirmação da inserção da construção *rd29A:DREB1A* foram utilizados 3 conjuntos de *primers* que amplificam diferentes regiões dentro da construção. Os *primers* 29AP5H-F / NosTProx-R (Figura1, *primers* a-b) amplificam um fragmento de 1,67 kilobase (kb) , entre o promotor *rd29A* e parte do terminador *NOS*. Já os *primers* Atrd29Dreb-F/ Atrd29Dreb-R (Figura1, *primers* c-d) amplificam um fragmento de 0,59kb entre o promotor *rd29A* e a região codante *DREB1A*. Enquanto os *primers* RTDreb-F/ RTDreb-R (Figura1, *primers* e-f) amplificam apenas um fragmento de 0,11kb dentro da região codante *DREB1A*. A construção *rd29:GUS* foi amplificada pelo conjunto de *primers* 29AP5H/NosTProx, (Figura 1, *primers* a-b) gerando um fragmento (a-1, b-1) de 2,85kb promotor *rd29A* e o terminador *NOS*. Para amplificação da construção *ahas* utilizou-se o conjunto de *primers* Ahas1/ Ahas2 (Figura1, g-h) que gera um fragmento de 0,69kb entre a região promotora e codante. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600 e o produto das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3% e visualizados em transluminador.

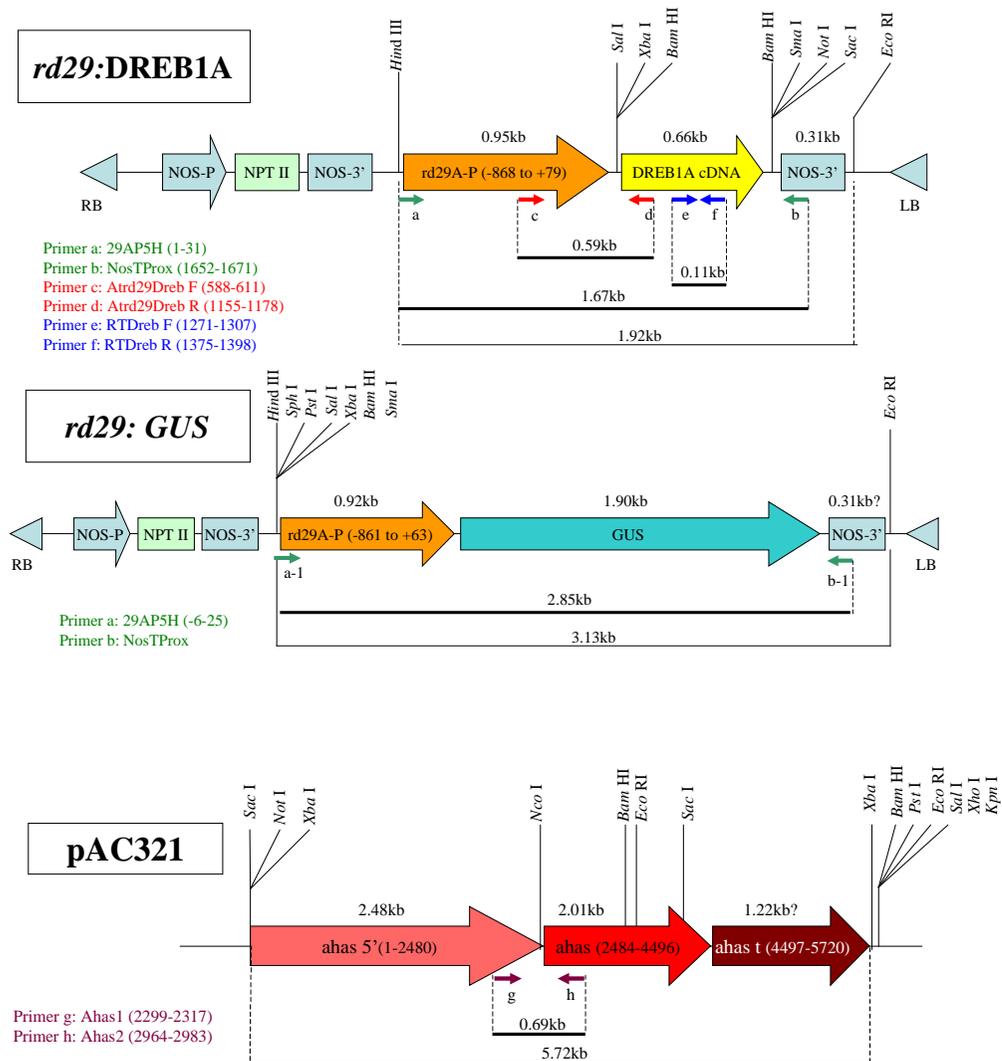


Figura 1: Construções utilizadas na transformação, *rd29A:DREB1A*, *rd29A:GUS* e pAC321. Os primers utilizados para amplificação dos fragmentos e o tamanho dos produtos gerados estão indicados na figura.

Ensaio Histoquímico

Para avaliar a indução do promotor *rd29A* em soja, foi realizado ensaio histoquímico, utilizando embriões que receberam tiros com micropartículas contendo o plasmídeo pBI *rd29:GUS* e folíolos provenientes de plantas positivas para essa construção.

Expressão transiente em embriões de soja

Os embriões transformados após serem retirados do meio de indução ao crescimento, foram submetidos a um período de desidratação celular entre 1 e 4 horas de exposição à temperatura de 37°C em estufa. Após esse período de indução ao déficit hídrico foi adicionado o tampão de reação X-Gluc, em um volume suficiente para cobrir as amostras. A placa contendo as amostras foi vedada e incubada no escuro a uma temperatura de 37°C, por aproximadamente 16 horas. Ao final desse tempo o tampão de reação foi retirado e adicionou-se etanol 70% para interromper a reação e armazenar as amostras, as quais foram visualizadas em microscópio estereoscópio modelo SQZ-DS4-BI (*Tecnival*).

Expressão estável em plantas de soja

Em cada planta: P1234, P1251 e P1263A positivas para a construção *rd29A:GUS*, foi coletado um folíolo, e como controle, foi coletado um folíolo de uma planta positiva para construção *35S:GUS*, com expressão constitutiva. Os folíolos de cada planta foram divididos em oito partes correspondendo aos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180

minutos de desidratação celular. Esses folíolos foram colocados em placa Petri e levados a estufa a 37°C para a indução do promotor *rd29A*. Ao final de cada tempo determinado, foi adicionado o tampão de reação X-GLUC em cada amostra em um volume suficiente para cobrir as amostras. A placa contendo as amostras foi vedada e incubada no escuro a temperatura de 37°C, aproximadamente 16 horas. Ao final desse tempo o tampão de reação foi retirado e adicionou-se etanol 70% para interromper a reação, retirar a clorofila dos folíolos e armazenar as amostras, as quais foram visualizadas em microscópio estereoscópio modelo SQZ-DS4-BI (*Tecnival*).

Análise da expressão gênica

O nível de expressão do transgene *AtDREB1A* foi analisado na planta parental nomeada P58-R0 e em uma planta pertencente a sua progênie nomeada P58-R1-01. Para analisar o nível de expressão na planta P58-R0 foi realizado um experimento de suspensão da irrigação (Exp.1) e para analisar o nível de expressão na planta P58-R1-01 foi realizado um experimento de desidratação celular (Exp.2).

Coleta material biológico

Experimento 1 - Suspensão da irrigação

A irrigação foi suspensa por 36 horas no vaso da planta P58-R0 e mais três plantas positivas para GUS. A planta positiva para inserção de *AtDREB1A*, nomeada P58-R0

teve as amostras de folhas coletadas em três condições diferentes. A primeira coleta foi realizada após a planta ser submetida ao déficit hídrico total (suspensão de irrigação por 36 horas, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR $60\% \pm 5\%$), a segunda coleta ocorreu 30 dias após a reidratação, sendo coletado parte de um novo folíolo que não foi submetido ao estresse e parte de um folíolo já existente durante o estresse. Como controles negativos foram coletados, folíolos da planta transformada, mas não positiva nomeada 232, e da planta não transformada, nomeada BR-16.

Experimento 2 – Desidratação celular

Para a análise da expressão gênica da planta P58-R1-01, foram coletados dois folíolos pertencentes ao mesmo trifólio em cada planta utilizada no experimento. As plantas utilizadas foram: P58-R0 e P58-R1-01 positivas para a construção *rd29A:DREB1A* e como controles negativos foram utilizadas as plantas BR-16 não transformada e AHAS transformada apenas com o gene *ahas*. Um folíolo correspondeu ao tempo 0 min. (utilizado como controle da expressão do gene *AtDREB1A*) e o segundo folíolo foi utilizado no tratamento de desidratação celular por 90 min sob exposição à luz solar em casa de vegetação, ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR $60\% \pm 5\%$) para a indução do promotor *rd29A* e expressão de *AtDREB1A*.

Extração RNA

Os folíolos foram coletados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a -80°C . A extração de RNA total foi feita utilizando reagente trizol (*Invitrogen – Life Technologies*), conforme recomendações do fabricante.

Transcrição Reversa (Produção de cDNA)

As reações de transcrição reversa ocorreram utilizando-se a enzima *transcriptase reversa* (*Moloney Murine Leukemia Virus* - M-MLV) para obtenção do cDNA de acordo com Panchuk et al. (2002).

PCR em tempo real

Para cada gene (*rd29A:DREB1A* e *RNAr 18S*), primeiramente foi realizada uma curva de eficiência de amplificação, conforme recomendado pela *Applied Biosystems, Foster, CA, USA*. Para gerar esta curva foi feita uma série de diluições do cDNA (10 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), sendo a placa do experimento montada em triplicata tanto para o gene alvo quanto para o endógeno, o que permitiu verificar a eficiência de amplificação dos *primers* na reação e a melhor concentração a ser utilizada. Os parâmetros de ciclagem para as reações foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min., e 45 ciclos de 95°C por 15 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg., sendo os dados coletados na fase de extensão (72°C). O gene *RNAr 18S* (nº. de acesso: X02623.1) foi utilizado como controle endógeno em cada tratamento para a normalização das amostras.

A magnitude do sinal de fluorescência produzido por cada reação durante os ciclos de PCR, é indicado pelo valor de ΔRn , que é calculado pela subtração da intensidade do sinal de fluorescência (Rn) e da linha de base. O *threshold* é a linha cuja intersecção com a curva de amplificação define o Ct e é calculado a partir do ciclo 3 ao 15.

Para o cálculo de quantificação relativa foi utilizado o método Ct. Onde o nível de expressão (RQ) é calculado pela subtração do Ct da amostra de cada tratamento com o Ct do controle endógeno, gerando o ΔCt . Este valor de ΔCt dos tratamentos é subtraído do valor de ΔCt da amostra controle (calibrador), resultando num valor de $\Delta\Delta Ct$. O valor de RQ agora é calculado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde o valor 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo (100%=1) e do controle endógeno (100%=1) obtidos através da curva de eficiência de amplificação. As análises de quantificação relativa seguiram os mesmos parâmetros de ciclagem e coleta de dados das amostras, utilizados para gerar a curva de eficiência de amplificação. Os resultados foram analisados pelo programa *Sequence Detection* (Perkin Elmer).

Os *primers* utilizados nas reações, foram desenhados pelo programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), próximo à região 3' do gene, obtendo *amplicons* de aproximadamente 150 pares de base (pb). As reações de PCR foram realizadas, em termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem, Foster, CA, USA), utilizando-se o Kit *Platinum® SYBER® Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen – Life Technologies), conforme recomendações do fabricante.

Resultados

Análises de PCR

No período de sete meses foram transformados 9484 embriões. Entretanto, de 4493 embriões bombardeados e transferidos para casa de vegetação, um total de 1598 embriões multibrotados se regeneraram e se desenvolveram, sendo 941 plantas testadas por

PCR para presença do transgene (Tabela 1). Como resultado da amplificação por PCR, 17 plantas (1.8% das plantas analisadas por PCR) foram confirmadas possuir o transgene (Tabela 2), o equivalente a 0.38% de embriões regenerados em relação aos 4493 embriões transformados. Entretanto, essa taxa pode ser superior ao final das análises em plantas a serem testadas que estão em casa de vegetação.

Até o momento, a transmissão do transgene foi confirmada em 4 indivíduos pertencentes à progênie da primeira geração da planta P58-R0.

Tabela1. Resultados obtidos pelo processo de transformação

| Data Transformação | Co-transform.*** | No. de embriões usados para transformação | No. of plantas transferidas para areia :vermiculita | No. of plantas transferidas para casa de vegetação | No. de plantas testadas por PCR**** | No. de plantas ainda a serem testadas em casa de vegetação**** | No. de plantas positivas confirmadas por PCR***** | | | |
|------------------------|------------------|---|---|--|-------------------------------------|--|---|-----------|----------|-----------------------|
| | | | | | | | AHAS | DREB | GUS | Total |
| 16/2/2005 | Ahas/Dreb | 206 | 135 | 73 | 30 | 43 | | | | |
| 17/2/2005 | Ahas/Dreb | 139 | 91 | 51 | 29 | 12 | | | | |
| 18/2/2005 | Ahas/Dreb | 203 | 162 | 79 | 34 | 45 | 1 | 1 | | 1 |
| 23/2/2005 | Ahas/Dreb | 227 | 141 | 66 | 51 | 15 | | | | |
| 24/2/2005 | Ahas/Dreb | 359 | 260 | 162 | 165 | 3 | 2 | 2 | | 2 |
| 25/2/2005 | Ahas/Dreb | 216 | 147 | 98 | 31 | 67 | 1 | 3 | | 3 |
| 26/2/2005 | Ahas/Dreb | 98 | 69 | 41 | 34 | 7 | 5 | 6 | | 6 |
| 2/3/2005 | Ahas/Gus | 213 | 128 | 63 | 58 | 5 | | | | |
| 3/3/2005 | Ahas/Dreb | 376 | 271 | 97 | 48 | 49 | | | | |
| 4/3/2005 | Ahas/Gus | 195 | 151 | 88 | 67 | 21 | 1 | | 1 | 1 |
| 5/3/2005 | Ahas/Dreb | 191 | 129 | 39 | 28 | 11 | | | | |
| 9/3/2005 | Ahas/Dreb | 266 | 209 | 133 | 73 | 60 | | | | |
| 10/3/2005 | Ahas/Gus | 273 | 198 | 119 | 66 | 53 | | | | |
| 11/3/2005 | Ahas/Dreb | 135 | 98 | 44 | 27 | 17 | | | | |
| 16/3/2005 | Ahas/Gus | 275 | 208 | 63 | 24 | 39 | | | | |
| 17/3/2005 | Ahas/Dreb | 399 | 240 | 143 | 93 | 50 | | | | |
| 18/3/2005 | Ahas/Dreb | 212 | 130 | 76 | 35 | 41 | | | | |
| 23/3/2005 | Ahas/Dreb | 248 | 162 | 99 | 35 | 64 | | | | |
| 24/3/2005 | Ahas/Dreb/Gus | 262 | 138 | 64 | 13 | 51 | 4 | 3 | 1 | 4 |
| Subtotal | - | 4493 | 3067 | 1598 | 941 | 653 | 14 | 15 | 2 | 17 |
| Sobrev.* | - | - | 68%* | 52%*(35%)** | 58%*(20%)** | - | - | - | - | 1.8%*(0.38%)** |
| 30/3/2005 | Ahas/Gus | 238 | 120 | 33 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 6/4/2005 | Ahas/Dreb | 219 | 116 | 38 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 8/4/2005 | Ahas/Dreb | 162 | 130 | 76 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 13/4/2005 | Ahas/Gus | 195 | 102 | 27 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 15/4/2005 | Ahas/Dreb | 127 | 73 | 14 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 29/4/2005 | Ahas/Dreb | 283 | 54 | 4 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 11/5/2005 | Ahas/Gus | 245 | 113 | 8 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 19/5/2005 | Ahas/Dreb | 216 | 132 | 54 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 25/5/2005 | Ahas/Gus | 268 | 103 | 48 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 10/6/2005 | Ahas/Dreb | 268 | 130 | 35 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 15/6/2005 | Ahas/Gus | 213 | 80 | 41 | (Não testadas) | (Não testadas) | | | | |
| 22/6/2005 | Ahas/Gus | 100 | | | | | | | | |
| 29/6/2005 | Ahas/Dreb | 236 | | | | | | | | |
| 1/7/2005 | Ahas/Dreb | 414 | | | | | | | | |
| 6/7/2005 | Ahas/Gus | 121 | | | | | | | | |
| 8/7/2005 | Ahas/Dreb | 126 | | | | | | | | |
| 13/7/2005 | Ahas/Dreb | 203 | | | | | | | | |
| 15/7/2005 | Ahas/Dreb | 366 | | | | | | | | |
| 20/7/2005 | Ahas/Dreb | 320 | | | | | | | | |
| 22/7/2005 | Ahas/Dreb | 161 | | | | | | | | |
| 27/7/2005 | Ahas/Gus | 235 | | | | | | | | |
| 5/8/2005 | Ahas/Dreb | 275 | | | | | | | | |
| Total | - | 9484 | 4220 | 1976 | 941 | ? | - | - | - | - |
| Survival ratio* | - | - | - | - | - | ? | - | - | - | - |

* Porcentagens em relação ao valor da etapa anterior

** Porcentagens entre parênteses são sempre em relação ao número inicial de embriões bombardeados

*** Cotransformação dos plasmídios pBIG rd29:Dreb1A ou pBI rd29:Gus com pAC321 (Ahas).

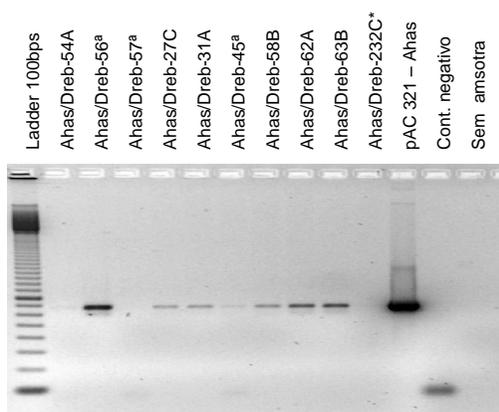
**** Plantas sem tamanho suficiente para serem testadas ou já mortas.

Tabela 2. Relação das plantas positivas para as construções rd29: Dreb1A, rd29:Gus e Ahas

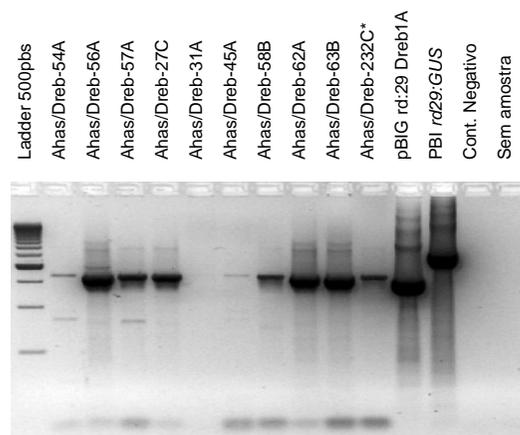
| Número de plantas postivas | Identificação | Data da Transformação | Transgene |
|----------------------------|----------------|-----------------------|------------|
| 1 | Ahas/Dreb-45A | 18/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 2 | Ahas/Dreb-27C | 24/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 3 | Ahas/Dreb-31A | 24/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 4 | Ahas/Dreb-54A | 25/02/2005 | Dreb |
| 5 | Ahas/Dreb-56A | 25/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 6 | Ahas/Dreb-57A | 25/02/2005 | Dreb |
| 7 | Ahas/Dreb-63B | 26/02/2005 | Dreb |
| 8 | Ahas/Dreb-58B | 26/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 9 | Ahas/Dreb-66B | 26/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 10 | Ahas/Dreb-59B | 26/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 11 | Ahas/Dreb-61A | 26/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 12 | Ahas/Dreb-62A | 26/02/2005 | Ahas, Dreb |
| 13 | Ahas/Gus-55A | 04/03/2005 | Ahas, Gus |
| 14 | Ahas/Dreb-539A | 24/03/2005 | Ahas, Dreb |
| 15 | Ahas/Dreb-382B | 24/03/2005 | Ahas, Dreb |
| 16 | Ahas/Dreb-345A | 24/03/2005 | Ahas, Dreb |
| 17 | Ahas/Gus-440B | 24/03/2005 | Ahas, Dreb |

Os resultados foram confirmados por diferentes reações de PCR utilizando conjuntos de primers, respectivos às construções, *rd29A:DREB1A*, *rd29:GUS* e *ahas*, conforme descrito na figura 1. Os géis confirmando a presença do transgene são apresentados na figura 2.

Primers AHAS, Ahas1 / Ahas2



Primers, 29AP5H / NosTProx (GUS ou DREB)



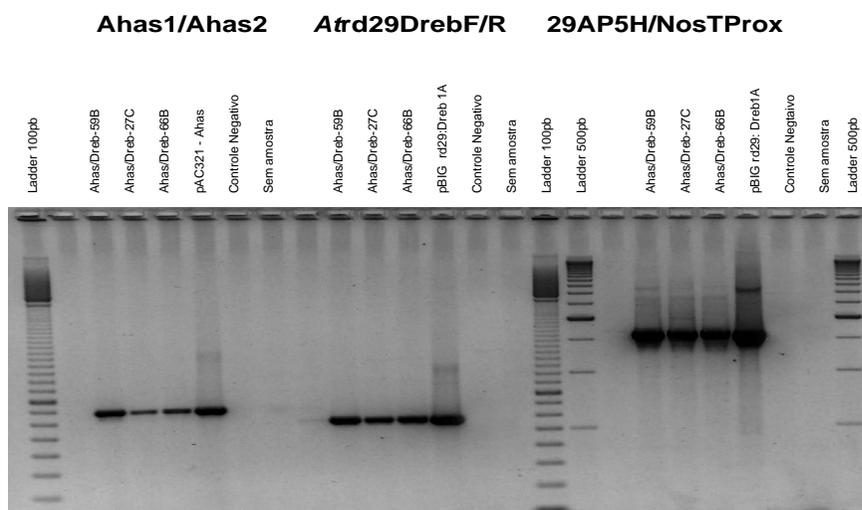
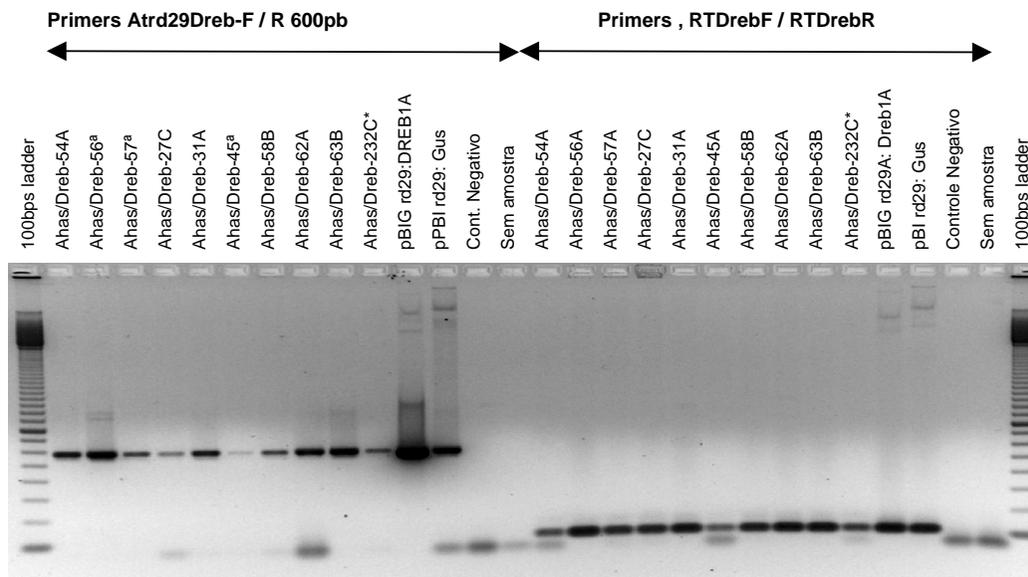


Figura 2: Exemplos de géis de agarose utilizados na confirmação do gene inserido.

Ensaio Histoquímico

Através do ensaio histoquímico foi possível identificar a indução do promotor *rd29A* em tecido foliar sob condições de desidratação celular e verificar a eficiência do processo de transformação em embriões. Esses resultados confirmam a eficiência do promotor *rd29A* em plantas de soja e a inserção do transgene pela técnica de biobalística em plantas positivas para inserção da construção *rd29A:GUS*, detectadas por PCR (Figura 3).

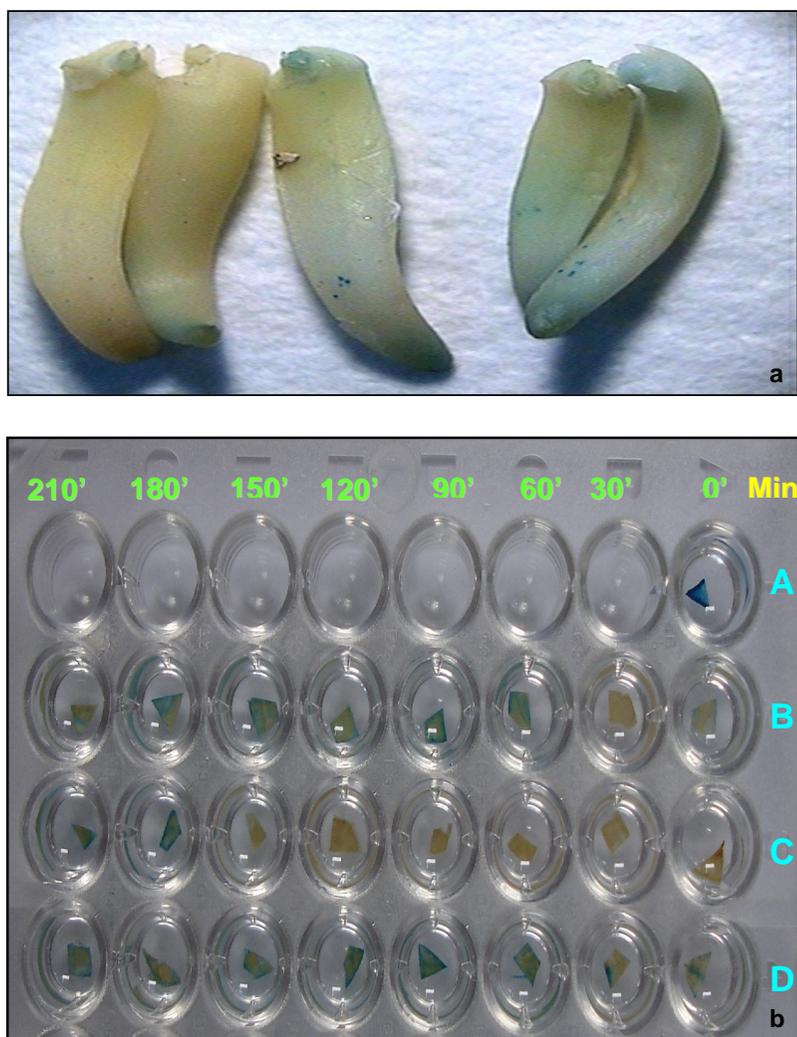


Figura 3: Ensaio histoquímico demonstrando a expressão de GUS dirigido pelo promotor *rd29A* em embriões de soja (a) e tecido foliar (b), induzidos por desidratação celular. **A-** 35S:GUS, controle. **B-** *rd29A*:GUS planta P1234. **C-** *rd29A*: GUS planta 1251. **D-** *rd29A*: GUS planta 1263A.

Análise da expressão gênica

A análise quantitativa feita por PCR em tempo real (RT-PCR) permitiu verificar os níveis de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* introduzido na plantas P58-R0 (parental) e P58-R1-01 (progênie), e demonstrou que o transgene é diferencialmente expresso em condições de déficit hídrico.

Para verificar a eficiência de amplificação de cada gene na reação, uma relação linear entre o ciclo em que a fluorescência foi detectada (Ct) e o log da concentração de DNAc foi produzida (Figura 4). Conforme diminui a concentração de cDNA, aumentou o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência (Ct). O resultado da curva de eficiência permitiu verificar que as faixas de concentrações utilizadas para os genes *AtDREB1A* e *GmRNAr 18S* produziram um coeficiente de determinação linear $R^2 = 0.99$, o que permite utilizar esta faixa de concentração nas análises de expressão sem que ocorra problemas de detecção.

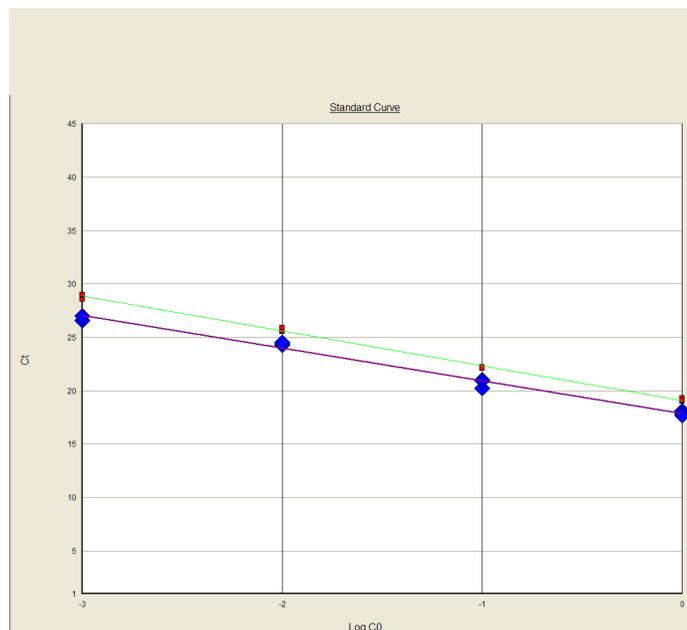


Figura 4: Curva de eficiência dos genes *GmRNAr 18S* (Rosa) e *AtDREB1A* (Verde).

Após 36 horas de déficit hídrico, foi detectado aumento do nível de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* na amostra coletada da planta P58-R0 no experimento 1. Trinta dias após a reidratação, ainda foi detectado aumento do nível de expressão na folha remanescente ao estresse. Entretanto, apesar de detectado algum nível de fluorescência nas plantas controles, o mesmo foi extremamente inferior quando comparado aos níveis das folhas em plantas submetidas ao déficit hídrico (Figura 5).

A planta P58-R0 contendo a construção *rd29A*: DREB1A em condição de déficit hídrico apresentou tolerância ao estresse e retomou o crescimento normal após a reidratação, em contraste, as plantas transformadas com a construção *rd29A*:*GUS* não apresentaram tolerância ao déficit hídrico.

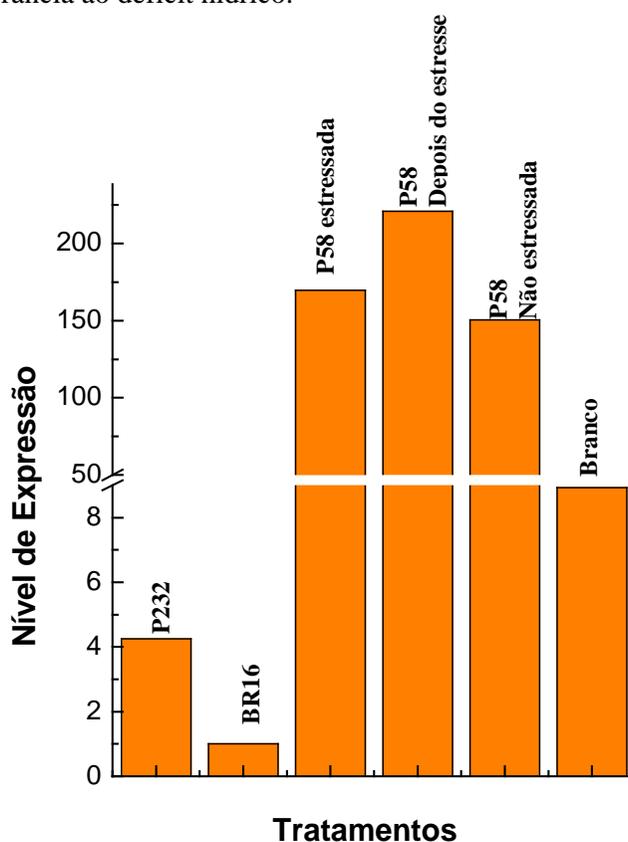


Figura 5: Nível de expressão do transgene *AtDREB1A* em soja no experimento 1, correspondente aos tratamentos utilizados: plantas controle negativo (P232 e BR-16), P58-R0 estressada (24 horas após a planta ser submetida a déficit hídrico total) P58-R0 depois estresse (30 dias após a reidratação), P58-R0 não estressada e branco (sem DNA).

No experimento 2 de desidratação celular, a indução do promotor *rd29A* ocorreu dentro de 90 minutos, assim como o aumento no nível de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A*, nos folíolos das plantas P58-R1 e P58-R0 (Figura 6). Entretanto as amostras utilizadas como controle negativo para a inserção da construção *rd29A:DREB1A* novamente apresentaram detecção de fluorescência, porém inferior aos níveis obtidos pelo fator de transcrição *AtDREB1A*. Isso ocorreu pela formação de dímeros de primers, como verificado na curva de dissociação (Figura 7) e eletroforese em gel de poliacrilamida do produto amplificado (Figura 8).

Esses resultados indicam que promotor *rd29A* de *A. thaliana* regula a expressão do fator de transcrição *DREB1A* durante o déficit hídrico em soja e confirma a estabilidade do transgene na planta P58-R1-01 pertencente à progênie da planta P58-R0.

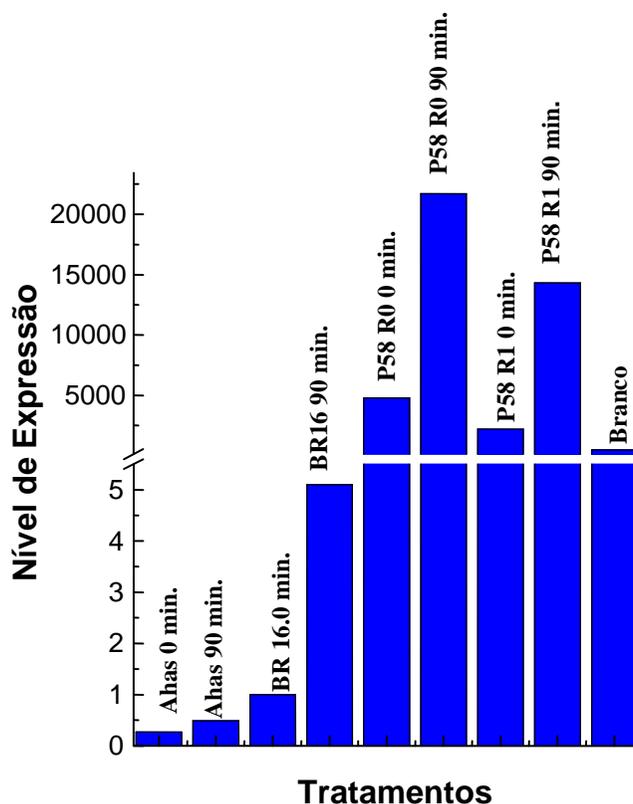


Figura 6: Nível de expressão do transgene *AtDREB1A* em soja sob condições normais e tratamento de desidratação celular durante 90 minutos. Amostras: Ahas e BR16, utilizadas como controles negativos; P58-R0 e P58-R1-01, contendo o gene alvo e branco.

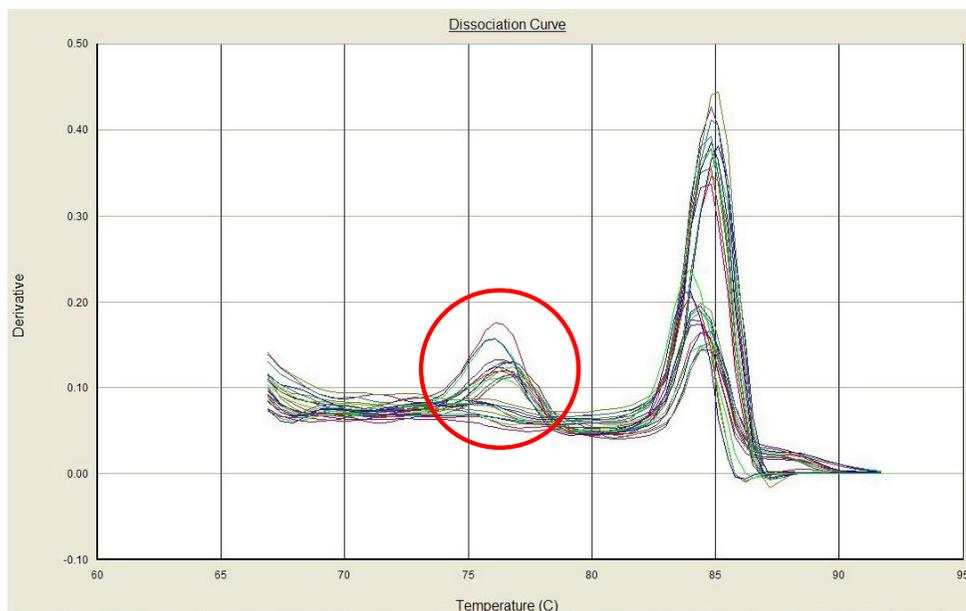


Figura 7: Curva de dissociação para o gene *AtDREB1A*. O círculo em vermelho indica a formação de dímeros de *primers*.

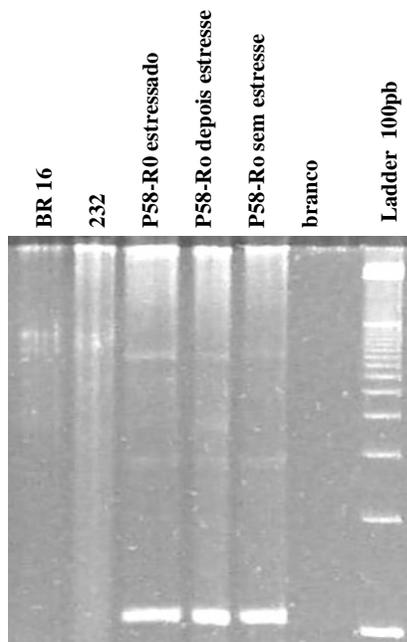


Figura 8: Gel de poliácridamida do gene *AtDREB1A* amplificado pela técnica de PCR em tempo real.

Discussão

O desenvolvimento da biologia molecular associado à tecnologia de transformação genética tem permitido o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a geração de plantas mais tolerantes a condições de déficit hídrico através da manipulação de genes que protegem e mantêm o funcionamento e a estrutura de componentes celulares (Wang et al., 2003; Maruyama et al.; 2004). Através do processo de transformação por biobalística, foi possível introduzir a construção *rd29A*:DREB1A em soja, gerando uma eficiência inicial de 1,8%. A transmissão do transgene foi confirmada em indivíduo pertencente à geração R1 (planta P58-R1-01).

A análise histoquímica de indução do promotor *rd29A* pela expressão da enzima β -glucuronidase (GUS) demonstrou que o promotor *rd29A* foi induzido por desidratação. O controle da expressão gênica é uma característica importante para a transferência genética quando relacionado ao fator de transcrição DREB1A, que controla a expressão de uma série de genes em resposta a estresse como seca. A expressão constitutiva de *AtDREB1A* pelo promotor 35S promove efeitos negativos no crescimento, afetando o desenvolvimento da planta como detectado em *A. thaliana* (Kasuga et al., 1999), tomate (Hiesh et al., 2002) e tabaco (Kasuga et al., 2004). Entretanto, a expressão de *AtDREB1A* controlada pelo promotor *rd29A* estresse induzido pode diminuir esses efeitos e promover tolerância à seca permitindo o aumento no nível de expressão de *AtDREB1A* apenas em condições de déficit hídrico (Kasuga et al., 1999; Kasuga et. al; 2004). Uma outra característica importante, é que esse promotor é induzido em todos os tecidos da planta, incluindo folhas e raízes, os quais funcionam como órgãos importantes na percepção e sinalização do estresse durante o déficit hídrico (Yamaguchi-Shinozaki, K. e Shinozaki, K., 1993). A atividade de GUS foi detectada em tecidos foliares sob condição de desidratação,

mas a análise em raízes e outras partes da planta ainda precisam ser realizadas, assim como a quantificação da atividade da β -glucuronidase em extratos de tecidos transformados, através de ensaio fluorométrico. A diferença de expressão observada em folíolos, pode ser devido a diferenças no tamanho das amostras, idade foliar ou número de cópias inseridas.

A proteína DREB1A contém uma região básica na extremidade N-terminal, que atua como um sinal de localização nuclear e uma região ácida na extremidade C-terminal que funciona como um domínio de ativação transcricional em plantas (Yamaguchi-Shinozaki et al, 2002; Liu et al, 1998). Uma série de genes *downstream* a DREB1A tem sido identificados e classificados em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam em resposta direta ao estresse como proteínas LEA, proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, proteínas que se ligam ao RNA, enzimas necessárias para a biossíntese de açúcares e inibidores de proteases. O segundo grupo contém fatores protéicos envolvidos na regulação do sinal de transdução como outros fatores de transcrição e enzimas envolvidas no metabolismo de receptores presentes na membrana plasmática (Oono et. al, 2003; Maruyama et al., 2004). O nível de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* foi altamente expresso em condições de déficit hídrico, sugerindo a ocorrência de aumento nos níveis de expressão de genes *up*-regulados por DREB1A. Os níveis de expressão de *AtDREB1A* analisados em folíolos dessa planta apresentou uma variação que pode estar relacionada ao início do estresse ou seja, a ativação do promotor e final do estresse, indicando a regulação pelo promotor e eficiência no aumento do nível de expressão de *AtDREB1A* em soja.

A diferença observada entre os níveis de expressão nos folíolos de P58-R1 e P58-R0 apesar de submetidos ao mesmo período de estresse (90 minutos - experimento 2) podem ser relacionados a diferenças no estágio de desenvolvimento da planta, tamanho e idade foliar. O nível de expressão detectado nas amostras transgênicas utilizadas como controle no nível de expressão de *AtDREB1A* (tratamento 0 min) pode estar relacionado à

agitação mecânica, no momento em que os folíolos foram destacados das plantas (Gilmour et al., 1998). Entretanto, em *A. thaliana* o nível de expressão do transgene *AtDREB1A* foi expresso acima dos níveis do gene *DREB1A* endógeno mesmo em condições controles, sem a indução ao déficit hídrico (Kasuga et al. 1999). Análises sobre o aumento do nível de expressão de genes por *DREB1A* e tolerância ao déficit hídrico em soja estão sendo iniciados.

Considerando a complexidade do mecanismo de resposta ao déficit hídrico ocasionado por seca, que pode variar de acordo com a intensidade e tempo de estresse, os resultados iniciais indicam que a expressão de *DREB1A* dirigida pelo promotor *rd29A* ambos de *A. thaliana* podem promover tolerância à seca em soja por transferência genética. Entretanto, análises mais precisas em níveis moleculares, fisiológicos e agronômicos estão em andamento para avaliar a eficiência desta estratégia na redução das perdas durante a seca em condições reais de campo. A tecnologia de transferência genética e a biologia molecular demonstram ser eficiente no desenvolvimento de genótipos de soja tolerantes à seca.

Referências Bibliográficas

Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theor Appl. Genet**, v.101, pp.1-6, 2000.

Aragão, F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report**, p.35-42. 2002.

Becker, D. Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. **Nucleic Acids Research**. v.18, nº1.

Bray, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol**. v.103, p.1035-1040. 1993.

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., Thomashow, M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. **Plant Journal**. v.16, p.433–442. 1998.

Hsieh, T.; Lee, J.; Charng, Y.; Chan, M. Tomato plants ectopically Expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**. v.130, p.618-626. 2002.

Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature America Inc**. p. 287-291, 1999.

Kasuga, M.; Miura, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiol**. v.45(3), p.346-350. 2004

Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. v. 10, p.1391-1406. 1998.

Maruyama, K.; Sakuma, Y.; Kasuga, M.; Ito, Y.; Seki, M.; Goda, H.; Shimada, Y.; Yoshida, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. **The Plant Journal**, 38, 982-993.

Oono, Y.; Seki, M.; Nanjo, T.; Narusaka, M.; Fujita, M.; Satoh, R.; Satou, M.; Sakurai, T.; Ishida, J.; Akiyama, K.; Lida, K.; Maruyama, K.; Satoh, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using *ca.* 7000 full-length cDNA Microarray. **The Plant Journal**, v.34, p.868-887. 2003.

Oya, T.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Farias, J. R. B.; Tobita, S.; Ito, O. Drought Tolerance Characteristics of Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Prod. Sci.** 7 (2):129-137. 2004.

Pellegrineschi, A.; Ribaut, J.-M; Trethowan, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Hoisintong, D. 2002. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. **JIRCAS Working Report** 55-60.

Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, k. Molecular responses to drought and cold stress. **Curr. Opin. Biotechnol.** 7, 161-167. 1996.

Wang, W.; Vinocur, B.; e Altman, A. Plant responses todrought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta.** 218:1-14, 2003

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Mol Gen Genet.** v.236, p.331-340. 1993.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell.** v.6, p.251-264. 1994.

5. Considerações Finais

Para a total expressão do potencial produtivo da agricultura brasileira, às condições de lavoura as quais as culturas são submetidas devem ser ótimas. Entretanto, estresses abióticos como a seca, tem reduzido significativamente os rendimentos das lavouras e restringido as áreas onde culturas comercialmente importantes como a soja podem ser plantadas. A adoção de estratégias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem visando aumentar a tolerância à seca, são imprescindíveis na manutenção da produtividade agrícola brasileira e mundial.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi aberta a possibilidade de isolar e clonar genes de diferentes organismos, assim como introduzi-los e expressá-los em diferentes espécies. Técnicas de engenharia genética, aliadas a técnicas de transformação vegetal, têm permitido não só identificar genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico, mas também modificá-los de forma a expressá-los em plantas geneticamente modificadas objetivando aumento na tolerância a seca.

A inserção do cassete de expressão *rd29A:DREB1A* de *A. thaliana* no genoma de plantas, é uma estratégia que tem demonstrado aumento de tolerância à seca em diferentes espécies vegetais. Uma característica importante no aumento de tolerância à seca promovida por esta estratégia é a ativação de uma ampla categoria de genes envolvidos na defesa celular contra a desidratação. Outro ponto chave desta estratégia é o fator de transcrição *AtDREB1A* ter sido colocado sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A*, o que possibilita a expressão da proteína *AtDREB1A* ocorra apenas em condições de déficit hídrico, não interferindo assim no crescimento da planta quando esta se encontra sob condições normais de disponibilidade hídrica.

O presente trabalho permitiu observar que em condições de déficit hídrico, o promotor *rd29A* de *A.thaliana* demonstra ser ativado em soja, pela proteína *GmDREB1A* endógena da soja, pois sob condições de desidratação celular ocorreu aumento do fator de transcrição *AtDREB1A*, introduzido pela técnica de biobalística. Entretanto, análises sobre o aumento do nível de expressão dos genes de defesa induzidos por *AtDREB1A* no genoma de soja, assim como, o possível aumento na tolerância ao déficit hídrico e seus efeitos nos parâmetros agronômicos da cultura estão sendo iniciadas.

Considerando a complexidade dos mecanismos de respostas ao déficit hídrico, o uso de técnicas de transformação para a introdução de genes e a utilização de estratégias moleculares na engenharia genética de rotas metabólicas agronomicamente importantes podem facilitar o desenvolvimento de novas variedades com maior tolerância à seca. Os eventos gerados serão de grande importância em programas de melhoramento, possibilitando que a característica de tolerância ao déficit hídrico seja introduzida em diferentes genótipos de soja, podendo desta forma atender interesses agronômicos determinados e auxiliar na redução das perdas ocasionadas por secas que constantemente tem afetado a cultura da soja.

6. Referências Bibliográficas

Alwine, J. C.; Kemp, D. J. e Stark, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:6745-6750, 1977.

AMBION. Disponível em <www.ambion.com>. Acesso em outubro, 2005.

ANBA - Agência de Notícias Brasil Árabe – consultado em novembro de 2005. Disponível no site:<<http://www.anba.com.br>>

Applied Biosystems. Disponível em <<http://www.appliedbiosystems.com>>. Julho/2005

Aragão, F. J. L.; Ribeiro, S. G. Detecção de Proteínas pela Técnica Elisa. In: Brasileiro, A.C.M. e Carneiro, V.T.C., (Ed.) Manual de transformação genética de plantas, Brasília, Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargem, p.143-154. 1998.

Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theor Appl. Genet**, v.101, pp.1-6, 2000.

Aragão, F. J. L. e Brasileiro, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **J. Plant Physiol.** Vol.14. n°1. 2002.

Aragão, F. J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report**, p.35-42. 2002.

Arndt, S. K.; Clifford, S. C., Wanek, W.; Jones, H. G.; Popp, M. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. **Tree Physiology.** v.21, 000-000. 2001.

Avonce, N.; Leyman, B.; Mascorro-Gallardo, J. O.; Van Dijck, P.; Thevelein, J. M.; Iturriaga, G. The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. **Plant Physiology**, v.136, p.3649–3659. 2004.

Australian Government-Bureau of Meteorology. Acesso em outubro de 2005. Disponível no site: <<http://www.bom.gov.au/climate/drought/livedrought.html>>

Aziz, A.; Larher, F. Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf disc submitted to osmotic stresses. **Plant Science**, Limerick, v. 112, p. 175-186, 1995.

Aziz, A.; Martin-Tanguy, J.; Larher, F. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, p. 153-163, 1997.

Baker, J.; Steele, C.; Dure, L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Mol Biol.** v.11, p.277-291.

Barros, L. M. G. & Carneiro, V. C. T. Eletroporação de protoplastos. In: Brasileiro, A.C.M. e Carneiro, V.T.C., (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília, Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargem, p. 35-49. 1998.

Beever, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento.** v.15, p.4-7. 2000.

Bhattacharjee, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, v.89, N°7. 2005.

Binns, A. N. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. **Physiologia Plantarum.** v.79, p.135-139. 1990.

Bonato, E. R. e Bonato, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina, EMBRAPA- Cnpso, 1987. 61p. (**EMBRAPA- Cnpso. Documentos, 21**)

Bowler, C.; Van, Montagu, M.; Inés, D. Superoxide desmutases and stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Biol.** v.43, p.83-116. 1992.

Boyer, J. S. Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy.* V.56.p.187-218. 1996. retirado do **site** www.nucleoestudo.ufla.br/gen/permuta/edicoes/2000/semiant.htm

Brasileiro, A.C.M. e Carneiro, V.T.C., (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília, Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargem, 1998. p.143-154.

Brasileiro, A. C.M.; Dusi, D.M.A. Transformação genética de plantas. **In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** P.679-735. Brasília, DF. Embrapa

Bray, E. A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* v.103, p.1035-1040. 1993.

Bray, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci.** v.2, 48-54, 1997.

Bray, E. A; Baley-Serres, J.; Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stress. In: Wang, W.; Vinocur, B.; e Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta.** v.218, p.1-14. 2003.

Brown, P. T. H; Lange, F. D.; Kranz; E.; Lorz, H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. **Molecular and general genetics**, v.237, p.311-317. 1993.

Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology.** 25:169-193, 2000.

Close, T. J.; Fenton, R. D.; Yang, A.; Asghar, R.; Demason, D. A.; Crone, D. E.; Meyer, N. C.; Moonan, F. Dehydrin: The protein. In Close, T. J. e Bray, E. A. Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental stress. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD. P104-118, 1993.

CNA- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em <www.cna.org.br>. Acesso em junho de 2004.

Colmer, T. D.; Epstein, E.; Dvorak, J. Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love amphiploid. **Plant Physiol.** v.108, p.1715-1724. 1995.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Junho/2005.

Embrapa: Conselho Nacional de Pesquisa da Soja. Disponível em <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em junho 2005.

Delauney, A. J.; Verma, D. P. S. Proline Biosynthesis and osmoregulation in plants. **Mol. Gen. Genet.** v.221, p.299-305. 1990.

Dimitrov, D. S., Sowers, A. E. Membrane electroporation: fast molecular exchange by electroosmosis. *Biochimica and Biophysics Acta; Biomembranes*, v.1022, p.381-392, 1990.

Dorak, M. T. **Real Time PCR Special Issue.** v.25. 2004

Droste, A.; Pasquali, G. Badanese-Zanettini. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L). Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue. **Euphytica.** v.127, p.367-376, 2002.

Dubouzet, J.G.; Sakuma, Y.; Ito, Y.; Kasuga, M.; Dubouzet, E.D.; Miura, S.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Os-DREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. **Plant Journal.** v.33, p.751-763. 2003.

Dure, L. I. Structural motifs in LEA proteins. In: Close, T. J. e Bray, E. A. Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD. p.91-103, 1993.

Eisen, M. B. & Brown, P. O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Meth. Enzymol.** 303:174-205, 1999.

Elbein, A. The metabolism of α,α -trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* v.30, 227-256.1979.

Elbein, A.D.; Pan, Y.T.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology.** vol.13, no.4, p.17R-27R. 2003.

Engvall, E.; Perlman, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. *Transformação genética de plantas.* In: Aragão, F. J. L.; Ribeiro, S. G. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** P.679-735. Brasília, DF. Embrapa

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em www.fao.gov
Acesso em setembro 2005.

Flexas, J.; Medrano, H. Energy dissipation in C₃ plants under drought. **Functional Plant Biology** 29, 1209-1215. 2002.

Flores, H. E.; Galston, A. W. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. II. Relation to amino acid pools. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 75, p. 110-113, 1984.

Foodcrops and Shortages – N°. 2 - Junho 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/giews>

Foyer, C. H.; Noctor, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. In: Chaves, M. M. e Oliveira, M. M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**. v. 55, N° 407, p.2365-2384. 2003.

Freeman, W. M.; Robertson, D. J.; Vrana, E. Fundamentals of DNA Hybridization Arrays for Gene Expression Analysis. **BioTechniques**. 29:1042-1055, 2000.

Gad, A. E.; Rosenberg, N and Altman. Liposome-mediated gene delivery into plant cells. **Physiologia Plantarum**. v.79, p.177-183, 1990.

Galston, A. W.; Kaur-Sawhney, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: Davies, P. J. (Ed.). **Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 280-295.

Galston, A. W.; Kaur-Sawhney, R.; Altabella, T.; Tiburcio, A. F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 110, p. 197-207, 1997.

Gama, M. I. C. S. In: Brasileiro, A.C.M. e Carneiro, V.T.C., (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**, Brasília, Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargem, 1998. p.180-189.

Garay-Arroyo, A.; Colmenero-Flores, J. M.; Garcarrubio, A.; Covarrubias, A. A. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during condition of water deficit. **J Biol Chem**. v.275, p.5668-5674. 2000.

Gelvin, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 16-37, mar. 2003.

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M. & Thomashow, M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. **Plant Journal**. v.16, p.433-442. 1998.

Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. An overview of Real-Time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p. 386-401, 2001.

Griesbach, R. J. and Hammond, J. An improved method for transforming plants through electrophoresis. **Plant Science**. v.102, p.81-89. 1994.

Guimarães, P. M.; e Santana, E. F. **Relatório anual de biossegurança da Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, doc.92, Brasília, 2003.

Gunter, N. and Spangenberg, G. Plant transformation by microinjection techniques. **Physiologia Plantarum**. v.79, p 213-217. 1990.

Hao, D., Yamasaki, K., Sarai, A., and Ohme-Takagi, M. Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, CBF1 and NtERF2, to the DRE and GCC motifs. **Biochemistry**. v. 41, p.4202–4208. 2002.

Hosy, E.; Vasseur, A.; Mouline, K.; Dreyer, I.; Gaymard, F.; Porée, F.; Boucherez, J.; Lebaudy, A.; Bouchez, D.; Very, A. A.; Simonneau, T.; Thibaud, J. P. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. **PNAS** vol.100, Nº 9, 5549-5554. 2003.

Hsieh, T.; Lee, J.; Charng, Y.; Chan, M. Tomato plants ectopically Expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**. v.130, p. 618-626. 2002.

Hu, C.Y and Wang, L. In planta soybean transformation technologies developed in China: procedure, confirmation and field performance. In Vitro Cell. Dev. **Biol.-Plant**, v.35, p. 417-420. 1999.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Consultado em novembro de 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

Javot, H. e Maurel, C. The Role Aquaporins in Root Water Uptake. **Annals of Botany** 90: 301-313.

Jofuku, K. D.; den Boer, B. G. W.; Van Montagu, M.; Okamoto, J. K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. **Plant Cell**. v.6, p.1211-1225. 1994.

Kaeppler, H.; GU, W.; Somers, D.A.; Rines, H. W.; Cockburn, A. F. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. **Plant Cell** . v.9, p.415-418. 1990.

Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature America Inc**. p. 287-291, 1999.

Kasuga, M.; Miura, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, 45(3), 346-350. 2004.

- Kinight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev Cytol.* v.195, p.269-325. 2002
- Kisis, D.; Lumbrellas, V.; Pages M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. **FEBS Letters.** v.498, p.187-189. 2001.
- Kohli, A.; Gahakwa, D.; Vain, P.; Laurie, D. A.; Chritou. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. **Planta.** v.208, p.88-97, 1999.
- Lacorte, C. e Romano, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. **In:** Brasileiro, A.C. & Carneiro, V.T.C. (Ed.).Manual de Transformação Genética de Plantas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, 1998, p.93-107.
- Lam, E. Nucleic acids and proteins. p. 315-352. 1997. *In* P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.) **Plant Biochemistry.** Academic Press, San Diego, CA.
- Li, J.; Gong, X.; Lin, H.; Song, Q.; Chen, J.; Wang, X. DGP1, a drought-induced guard cell-specific promoter and its function analysis in tobacco. **Sci China Life Sci.** v.48, p.181-6. 2005.
- Liu, F.; Jensen, C. R.; Andersen, M. N. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development its implication in altering pod set. **Field Crops Reserch.** 2003.
- Liu, H.; Kawabe, A.; Mtsunaga, S.; Murakawa, T.; Mizukami, A.; Yanagisawa, M.; Nagamori, E.; Harashima, S.; Kabayashi, A.; Fukui, K. Obtaining transgenic plants using the bio-active beads method. **J Plant Res.** v.117, p.95-99. 2004.
- Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** v. 10, p.1391-1406. 1998.
- Luiz Pedro Bonetti, A polêmica dos transgênicos. **Ed** Centro UNICRUZ, 2001.
- Martin, K. J. & Pardee, A. B. Principles of differential display. **Methods Enzymatics.** 303:234-258, 1999.
- Martre, P.; Morillon, R.; Barrieu, F.; North, G. B.; Nobel, P. S.; Chrispeels, M. J. Plasma membrane aquaporinas play a significant role during recovery from water deficit. **Plant Physiology.** v.130, p.2101-2110. 2002.
- Maruyama, K.; Sakuma, Y.; Kasuga, M.; Ito, Y.; Seki, M.; Goda, H.; Shimada, Y.; Yoshida, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. **The Plant Journal,** 38, 982-993. 2004.
- Matz, M. V. e Lukyanov, S. A. Referent strategies of differential display: a pratic of application. **Nucleic Acids Res.** 26:5538-5543, 1998.

Maurel, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.48, p.399-429. 1997.

Mizoguchi, T.; Ichimura, K.; Shinozaki, K. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). 1997. In: Shinozaki, Y. K; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; et al. Biological mechanisms of drought stress response, **JIRCAS Working Reported**. p. 1-8, 2002.

Nanjo, T.; Kobayashi, M.; Yoshida, Y.; Kakubary, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**. 461: 205-210, 1999.

Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Farias, J. R. B.; Oya, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 23: 12-18, 2001.

Noctor, G.; Foyer, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* v.49, p.249-279. 1998.

Novais, C. M.; Alves, M. P. PCR em Tempo Real. Revista **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ed. 33. 2004.

Novillo, F.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R. e Salinas, J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Biology**. 101(11):3985-3990, 2004.

Oberschall, A.; Deák, M.; Torok, K.; Sass, L.; Vass, I.; Kovacs, I.; Fehér, A.; Dudits, D.; Horváth, G.V. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. **Plant J**. 24:437-446, 2000.

Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **Plant Cell** v.7, p.173-182. 1995.

Okamoto, J.K; Caster, B.; Vilarroel, R.; Van Montagu, M.; Jofuko, K. D. The AP2 domain of APETALA defines a large and new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.94, p.7076-7081. 1997.

Olhoft, P. M. & Somers, D. A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. **Plant Cell Rep.** v.20., p.706-711, 2001.

Oono, Y.; Seki, M.; Nanjo, T.; Narusaka, M.; Fujita, M.; Satoh, R.; Satou, M.; Sakurai, T.; Ishida, J.; Akiyama, K.; Lida, K.; Maruyama, K.; Satoh, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using *ca.* 7000 full-length cDNA Microarray. **The Plant Journal**, v.34, p.868-887. 2003.

Ort, D. R. When there is too much light. **In:** Chaves, M. M. e Oliveira, M. M. (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, v.55, N° 407. p. 2365-2384. 2001.

Paz, M. M.; Shou, H.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Banerjee, A. K.; Wang, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**. v.136, p.167-179, 2004.

Pellegrineschi, A.; Ribaut, J.-M; Trethowan, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Hoisintong, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. **JIRCAS Working Report**. p.55-60. 2002.

Pena, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Ortega, C.; Pina, J. A.; Durá-Vila, N.; Navarro, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v. 104, p. 183- 191, 1995.

Pereira, J. S.; Chaves, M.M. (1995) Plant responses to drought under climate change in Mediterranean-type ecosystems. **In:** Chaves, M. M. e Oliveira, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, v.. 55, Nº 407, p. 2365-2384. 2004.

Pimentel, C.; Perez, A. J. de la C. Estabelecimento de Parâmetros para a Avaliação de Tolerância a Seca, em Genótipos de Fejoeiro. **Revista PAB Pesquisa Agropecuária Brasileira**: Embrapa, 2001.

Preston, G. M.; Carroll, T. P.; Guggino, W. B. e Agree, P. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 proteins. **Science**. 256:385-387, 1992.

Qin, Feng; Yoh, Sakuma; Li, Jie; Liu, Qiang; Li, Yi-Qin; Shinozaki, Kazuo; Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko. Cloning and Functional Analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. **Plant Cell Physiol**. v.45. p.1042-1052. 2004.

Rácz, A. **Chaperones: protein folding in vivo, the role of molecular chaperones**. Artigo disponível no site: <http://www.chaperone.sote.hu/Examples.html>,2000.

Reddy, M. S. S., Dinkins, R. D.; Collins, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Rep**. v. 21, p.676-683. 2003.

Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. **Biol. Chem**. v.379, p.633–646. 1998.

Riechmann, J. L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O. e Samaha, R. R. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. 290:2105-2110, 2000.

Ritchie, S. W.; Hodges, T. K. Cell culture and regeneration of transgenic plants. **In:** Kung, S.; Wu, R., ed. *Transgenic plants*. San Diego: Academic Press, 1993.v.1,p.147-178.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v.290, p.998–1009. 2002.

- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* v. 46(9), p.1568-77, 2005.
- Sanford, J. C; Klein, T. M.; Wolf, E. D.; Allen, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particulate Science and Technology.** v.5:27-30.1987.
- Sanford, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum.** v.79, p.206-209, 1990.
- Schmidt, M. A.; Parrot, W. A. Quantitative detection of transgene in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. **Plant Cell Report,** v.20, p.422-428, 2001.
- Schroeder, J. I.; Allen, G. J, Hugouvieux, V.; Kwak, J. M.; Waner, D. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Mol. Biol.** v.52, p.627-658. 2001.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Abe,H.; Kasuga, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Hayashizaki, Y.; Shinozaki, K. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. **Plant Cell.** Vol. 13, p.61-72, 2001.
- Serrano, R.; Mullet, J. M., Rios, G.; Marquez, J. A.; de Lrrinoa, I. F.; Leube, M. P.; Mendizabal, I.; Pascual-Ahuir, A; Proft, M, M.; Ros, R., Montesinos, C. Aglimpse of the mechanisms of the homeostasis during salt stress. **J Exp Bot.** v.50, p.023-1036, 1999.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Curr. Opin. Plant Biol.** 7:161-167, 1996.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response, **Plant Physiol.** v.115, p.327-334, 1997.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi Shinozaki, K. Molecular Responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* v.3, p.217-223, 2000.
- Shinozaki-Yamaguchi, Y. K; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; et al. Biological mechanisms of drought stress response, **JIRCAS Working Reported** p. 1-8, 2002.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi Shinozaki, K., Seki, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* v.6, p.410-417. 2003.
- Siddique, M. R. B.; Hamid, A.; Islam, M. S. Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. *Bot. Bull. Acad. Sin* 40: 141-145. 1999.
- Smirnof, N. Plant resistance to environmental stress. **Curr. Opin. In Biotec.** 9:214-219, 1998.
- Smirnof, N. & Bryant, J. A.DREB takes the stress out of growing up. **Nature America Inc.** 17:229-230, 1999.

Somers, D. A.; Samac, D. A.; Olhoft, P. M. **Recent advances in legume transformation. Plant Physiol.** v.131, p 892-899, 2003.

Soongstad, D. D.; Somers, D, A & Griesbach, R. J. Advances in alternative DNA delivery techniques. **Plant Cell Tissue Org. Cult**, v.40, p.1-15, 1995.

Stanton B. G. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. **Microbiology and Molecular Biology Rewies.** p.16-37. 2003.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F. *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in responsive to low temperature and water deficit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**, p.1035–1040. 1997

Takahashi, S.; Katagigi, T; Hirayama, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Hyperosmotic stress induced a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. **Plant Cell Physiol.** v.42, p.214-222. 2001.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal.** 3ª edição. Porto Alegre.: Artmed, 2004.

Toorok, Z.; Goloubinoff, P.; Horvath, I., Tsvetkova, N.M.; Glatz, A.; Balogh, G.; Varvasovzki, V.; Los, D. A.; Vierling, E.; Crowe, J. H. ; Vigh, L. *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. **Proc Natl Acad Sci.** v.98, p.3098-3103, 2001.

Trajanowska, M. R. Alternative methods of plant transformation a short review. **Celular & Molecular Biology Letters.** v.7, p.849-858. 2002.

Velculescu, V. E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science.** 270:484-487, 1995.

Vitzthum, F. Geiger, G.; Bisswanger, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBER Green I and a standard ultraviolet transilluminator gelimaging system. **Anal Biochem.** 276(1):59-64, 1999.

Waditee, R.; Bhuiyan, M. N. H.; Rai, R.; Aoki, K.; Tanaka, Y.; Hibino, T.; Suzuki, S.; Takano, J.; Jagendorf, A. T.; Takabe, T.; Takabe, T. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. **PNAS.** V.102, n5, p.1318-1323. 2005.

Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. Plant responses todrought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218:1-14, 2003.

Watkinson, J. I.; Sioson, A. A.; Robinet, C. V.; Shukla, M.; Kumar, D.; Ellis, M.; Heath, L.S.; Ramakrishnan, N.; Chevone, B.; Watson, L. T.; Zyl, L. v.; Egertsdotter, U.; Sederoff, R. R.; Grene, r. Photosynthetic Acclimation Is Reflected in Specific Patterns of Gene Expression in Drought-Stressed Lobolly Pine. **Plant Physiol.** v.133. 2003.

Xiong, L.; Schumaker, K. S.; Zhu, J. K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, S165-S183. 2002.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Koizumi, M.; Uro, S.; Shinozaki, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. **Plant Cell Physiol.**33(3):217-224.1992.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Mol Gen Genet.** v.236, p.331-340. 1993.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell.** v.6, p.251-264. 1994.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Nakashima, K.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Shinwari, Z. K., Seki, M.; Shinozaki, K. Biological mechanisms of drought stress response. **JIRCAS Working Report.** p.1-8. 2002.

Yamashita et al. 1991. *apud.* Aragão, J. L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. **JIRCAS Working Report.** p.35-42, 2002.

Yang, G.; Rhoades, D., Joly, R. J. Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficient and glycinebetaine-containing maize lines. **Aust J Plant Physiol.** v.23, p.437-443. 1996.

Zhang, Z.; Guo, Z.; Shou, H. Pegg, S. E.; Clemente, T. E.; Staswick, P. E.; Wang, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean. **In:** Plant Genetic Engineering, A.D. Arcibia (Ed.). Dec., P. 88-94. 2000.

Zhang, H. T.; Kacharina, J. E.; Miyashiro, K.; Greene, M. I.; James, E. Protein Quantification from complex protein mixtures using a proteomics methodology with single-cell resolution. Departments of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia. Disponível em www.uphs.upenn.edu/neur.surg/faculty/orourke.html.

Zhu, J. K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Curr Opin Plant Biol.** 53:247-73, 2001.

ANEXOS

ANEXOS I – Protocolos

1. Células Eletrocompetentes de *Escherichia coli*

- Obter colônias isoladas à partir do estoque em glicerol, crescer uma colônia overnight em 10mL de meio LB a 37°C, a 200 rpm (pré-inóculo).
- Inocular 5mL do pré-inóculo em 500mL de meio LB e crescer a 37°C com agitação 300 rpm, até atingir OD₆₀₀ 0,5 a 0,7.
- Manter as células no gelo por aproximadamente 20 min. Assepticamente, transferir as células para tubos de centrifuga pré-resfriados em gelo.
- Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 500mL de glicerol 10% gelado.
- Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 250mL de glicerol 10% gelado.
- Centrifugar a 7.500 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 20mL de glicerol 10% gelado. Transferir para tubos de 30mL estéril e centrifugar a 7.200 rpm por 15 min a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 1 a 2mL de glicerol 10% gelado. Alicotar em eppendorf e armazenar a - 80°C por até 6 meses.

2. Transformação Via Eletroporação

No processo de transformação por eletroporação foi seguido o protocolo de Miller & Nickoloff (1995). O aparelho utilizado para a transformação foi um eletroporador Micro pulser, Bio-Rad.

- Preparar o eletroporador para 2.5 kV, 25 μ F, preparar o controlador de pulso para 200 ou 400 ohms. O controlador de pulso é necessário quando altas voltagens são aplicadas sobre curtas distâncias entre eletrodos em amostras com alta resistência.
- Misturar 40 μ L de células eletrocompetentes em eppendorf 1,5mL com 2 μ L de DNA (5pg a 0.5 μ g de DNA plasmidial). Misturar a solução no tubo gentilmente e incubar no gelo por 1 min.
- Transferir o DNA e as células para a cubeta pré-resfriada em gelo, agitar levemente para acomodar as células no fundo da cubeta, secar o gelo e a água da cubeta.
- Colocar a cubeta na câmara do eletroporador. Aplicar o pulso.
- Remover a cubeta e imediatamente adicionar 1mL de meio SOC. Transferir a suspensão de células para tubo Falcon de 15mL estéril e incubar a 37°C por 1 h com agitação de 225 rpm.
- Espalhar com alça 60 μ L de IPTG/X-Gal (50 μ l de IPTG 0,1M e 10 μ L der X-Gal 50mg/mL) em placas com LB/antibiótico (100 μ g/placa), deixar secar por 30 min.

3. Transformação por biobalística

3.1 Assepsia de Sementes de Soja para Transformação por Biobalística

- Pesar 70 g de sementes da variedade conquista e estas serão deixá-las em etanol 70% por 10 minutos;
- Passar para hipoclorito 1 % (V/V) por 20 minutos;
- Lavar com água destilada autoclavada em fluxo, e deixar hidratar “overnight”;
- Enxaguar novamente com água destilada autoclavada e deixar no recipiente até que sejam retirados os embriões;

3.2 Retirada dos Embriões

- Em um fluxo laminar, com auxílio de pinças e lâminas de corte estéreis, separar os embriões dos cotilédones tomando cuidado para a não contaminação dos embriões e danificação de seus primórdios foliares;
- Armazenar os embriões em placa de Petri esterilizada contendo água destilada também estéril;
- Retirar os primórdios foliares com auxílio de microscópio estereoscópio;
- Secar os embriões em papel de filtro com o ápice embrionário voltado para cima, mas evitar a dessecação;

Obs: Essa etapa é de grande importância, pois a água atrapalha a eficiência da transformação servindo como barreira na passagem das micropartículas as quais refratam.

3.3 Preparo de placas de suporte para o bombardeamento

- Para 200 embriões preparar 16 placas pequenas contendo sais *Murashige* e *Skoog Basal* (MS), 3% sacarose e 0,8% phytigel em pH 5,7;

Obs: É recomendável a utilização de phytigel (0,8 %) como agente solidificante do meio de cultura, pois este impossibilita a desagregação do meio de cultura durante a formação do vácuo para o bombardeamento devido à sua ligação iônica.

- Cada placa comporta 20 embriões que são colocados em pocinhos feitos manualmente com o auxílio de uma pinça dentro do raio de distribuição das micropartículas, e fora da “zona de morte”, que corresponde à região central onde a onda de choque é mais intensa;

Obs: Explantes que são posicionados na “zona de morte”, geralmente não sobrevivem após o impacto da onda de choque.

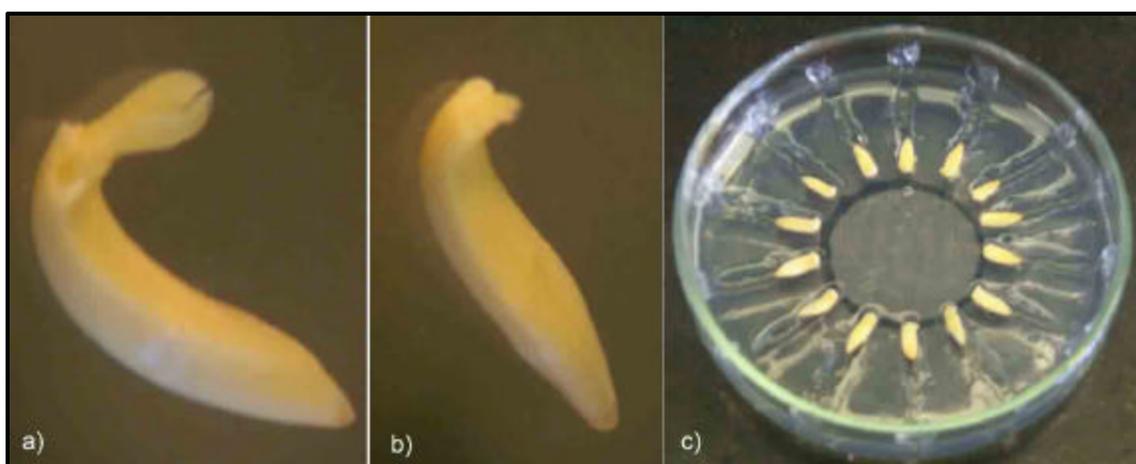


Figura 1. Eixo embrionário após retirada dos cotilédones (a). Eixo embrionário após retirada da folhas primárias (b). Embriões distribuídos em placa com meio MS/phytagel com e a região apical voltada para o centro da placa, pronta para bombardeamento (c).

3.4 Preparo das micropartículas de tungstênio para bombardeamento

- Pesar 60 mg de micropartículas de tungstênio M 10 suficiente para 100 tiros aproximadamente;
- Transferir para um tubo de microcentrifuga e, a ele acrescentar 10 mL de etanol 70%;
- Homogeneizar vigorosamente a mistura em um agitador durante 15 min., na velocidade mais baixa;
- Centrifugar a 15.000 x g durante 5 min;
- Remover o sobrenadante e descartá-lo;
- Adicionar ao tubo 1 mL de água destilada estéril;
- Homogeneizar vigorosamente em agitador;
- Centrifugar a 15.000 x g novamente por 5 min;
- Descartar o sobrenadante e realizar a operação de lavagem mais duas vezes;
- Após a última lavagem, descartar o sobrenadante e ressuspender as micropartículas em glicerol 50 % (V/V);

3.5 Precipitação do DNA sobre as micropartículas

- Toda vez que se for bombardear transferir uma alíquota de 50 μL da suspensão de micropartículas (60 mg/mL) para um tubo de microcentrífuga (Eppendorf® 1,5 mL);
- Se as micropartículas já estiverem preparadas, homogeneizá-las em sonificador por 15 min;

Obs: Este procedimento é importante para uma precipitação uniforme, evitando a aglomeração e conseqüente desuniformidade na quantidade de micropartículas a serem transferidas para microtúbos.

- Após a transferência das micropartículas adicionar 12 μL de DNA ao tubo (6 μg);
- Homogeneizar a suspensão vigorosamente com auxílio de uma micropipeta;
- Acrescentar à mistura 50 μL de CaCl_2 (2,5 M) e homogeneizar rapidamente agitando-se a parte externa do microtubo com as pontas dos dedos;
- Adicionar 20 μL de espermidina (0,1 M) na solução;
- Homogeneizar rapidamente e incubar a temperatura ambiente sob agitação lenta durante 10 min;
- Centrifugar durante 10 segundos (*spin*);
- Remover o sobrenadante cuidadosamente e descartá-lo;
- Acrescentar ao tubo 150 μL de etanol absoluto;
- A amostra será homogeneizada novamente agitando-se a parte externa do tubo com auxílio dos dedos evitando a ressuspensão do sedimento;
- Centrifugar a 15000 x g durante 10 seg;

- Remover o sobrenadante e repetir o procedimento de lavagem com etanol;
- Descartar o sobrenadante e adicionar 24 μL de etanol absoluto à amostra;
- Homogeneizar novamente a amostra e distribuir alíquotas de 3,2 μL na região central de cada membrana carreadora previamente posicionada no suporte de membranas. Cada precipitação é o suficiente para a preparação de 6 membranas carreadoras contendo micropartículas cobertas com DNA;
- Estocar estes suportes em uma placa contendo dissecante (sílica gel);

Obs: Este passo é importante, pois a exposição das micropartículas cobertas com DNA a condições de umidade relativa do ar acima de 50%, favorece a aglomeração das micropartículas resultando em redução na frequência de expressão do gene exógeno.

3.6 Manuseio do aparelho – *Gene Gun*

- Antes do bombardeamento, limpar a câmara de fluxo onde se encontra o *Gene Gun* com etanol 70 % e esterilizar com luz ultravioleta por 20 min.;
- Colocar todos materiais necessários para o disparo juntos ao operador. Os materiais serão: telas de retenção, placas de Petri contendo os embriões a serem bombardeados, membranas de ruptura dispostas em quatro e mergulhadas em glicerol, e as membranas carreadoras contendo o DNA exógeno;
- Verificar se a válvula de controle de entrada de gás hélio e vácuo no *Gene Gun* estão fechadas, em seguida abrir o registro do gás hélio (cilindro) verificando a pressão do gás na membrana ou na mangueira que deve ficar em torno de 1200 psi;
- Ligar a bomba de vácuo;
- Ligar o gatilho (aparelho que comanda a válvula selinóide na tomada);
- Posicionar o conjunto de membranas de ruptura na extremidade da câmara de alta pressão de gás hélio em um parafuso de vedação (parte superior do *Gene Gun*);
- Apertar bem para haver um bom posicionamento das membranas;
- Inverter a câmara de alta pressão encaixado-a na câmara de vácuo;
- Retirar o suporte do macrocarregador, e neste colocar as telas de retenção e as membranas de carreamento;
- Posicionar a placa de meio contendo os embriões a serem bombardeados na câmara de vácuo;
- Fechar a câmara de vácuo, a válvula de saída de gás hélio da câmara de alta pressão e a válvula de saída de vácuo;
- Abrir a válvula de entrada de vácuo vagarosamente, até a pressão do vácuo atingir 27 polegadas de Hg fechado-se em seguida;

- Abrir a válvula de entrada de gás hélio na câmara de alta pressão;
- Ao perceber um abaulamento da membrana de ruptura com a entrada de gás hélio, realizar o disparo apertando-se o gatilho;

Obs: Com o disparo, a velocidade de chegada das micropartículas no tecido deverá ser de 1500 Km/h. Esta velocidade é necessária para que as micropartículas contendo o DNA atravessem a parede do tecido vegetal, a membrana citoplasmática e a membrana do núcleo onde o DNA exógeno deverá ser incorporado ao genoma da planta.

- Após o disparo fechar a válvula de entrada de gás hélio, e abrir a válvula de saída deste gás da câmara de alta pressão;
- Abrir a válvula de saída de vácuo vagarosamente;

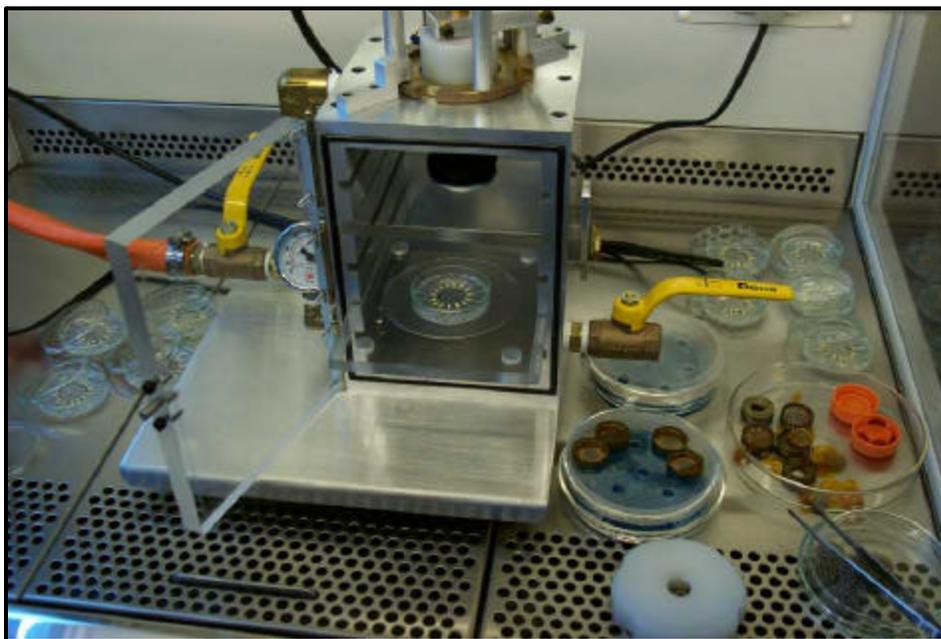


Figura 2: Aparelho *Gene Gun* com todos os materiais posicionados.

3.7 Seleção dos embriões transformados

- Após a transformação, transferir os embriões para placas de Petri contendo cada um sais (MS), 3% sacarose, 0,8% ágar, benzilaminopurina (BAP - 5 mg/mL), vitamina B5 em pH 5,7;
- Para 220 embriões utilizam-se 2 placas;
- Em uma placa transferir os embriões controle (20 não bombardeados), e em outra os 200 embriões bombardeados;
- Deixar essas placas ao abrigo da luz *overnight* ;
- No dia seguinte transferir os embriões 7 a 7 em recipientes plásticos contendo os mesmos componentes do meio para multibrotamento, mas com a adição de Imazapir ($0,15\mu\text{M}$) para a seleção dos embriões transformados;
- Para 200 embriões são utilizados 30 copos;
- Deixar esses embriões nesses copos por aproximadamente 45 dias em câmara de aclimatação a temperatura 28 °C, umidade relativa acima de 80 % e 16 horas de fotoperíodo e luminosidade de $50\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$;
- Após esse período, transferir os embriões para copos contendo uma mistura de areia : vermiculita (1:1) autoclavada e embebida em solução nutritiva a pH 6,6 (Henvitt, 1963);
- Manter os embriões nesses recipientes por mais quinze dias;
- Transferir os embriões para vasos contendo uma mistura de solo:areia (1:1) autoclavadas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas;

- Manter irrigação por gotejamento três vezes ao dia com duração cada uma de 5 min.;

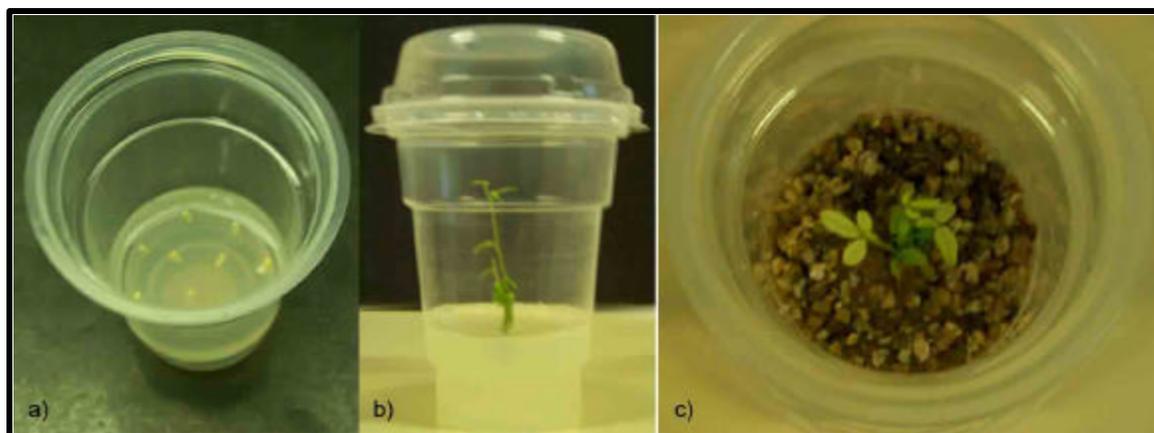


Figura 3: Embriões em meio seletivo (MS/IMZ) (a). Multibrotos em meio seletivo aptos a aclimação (b). Multibrotos em areia:vermiculita (c).

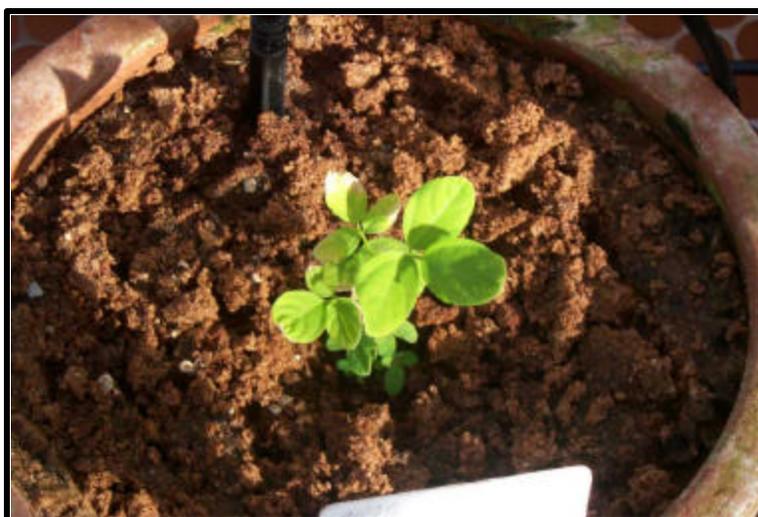


Figura 4: Multibrotos em vasos na casa de vegetação.

4. Extração de DNA em pequena escala (Edwards et al.,1991)

- Cortar a folha com a tampa do microtubo;
- Macerar o tecido fresco por 15 segundos;
- Adicionar 400 μ L de tampão EB-PCR;
- Agitar em vortex por 5 segundos;
- Centrifugar a 13000 x g por 5 min.;
- Transferir 300 μ L para um novo tubo;
- Adicionar 300 μ L de isopropanol;
- Deixar a temperatura ambiente por 2 min.;
- Centrifugar a 1300 x g por 5 min.;
- Descartar o sobrenadante. Secar o *pellet* (sedimento);
- Dissolver o sedimento em 50 μ L de TE 1 X+ RNase 40 μ g/mL;
- Usar 1 μ L para reação de PCR de 25 μ L;

5. Extração de DNA utilizando CTAB com algumas modificações (Keim et al., 1988)

- Coletar duas ou três folhas jovens e colocar em microtubos de 2 mL mantendo-os no gelo antes da armazenagem no *freezer*;
- Adicionar ao tubo com as folhas bolas metálicas de 4 mm de diâmetro;
- Colocar os tubos em nitrogênio líquido para gelarem;
- Macerar as amostras colocando-as geladas em vortex até a formação de um macerado fino;
- Adicionar 900 μL de tampão de extração e homogeneizar bem com ajuda do vortex;
- Incubar a 65°C por 1 h e então centrifugar a $2940 \times g$ por 10 min.;
- Transferir o sobrenadante para outro microtubo de 2 mL e adicionar 900 μL de Clorofórmio Álcool Isoamílico (24:1);
- Homogeneizar por 10 min. com suaves inversões e centrifugar a $13800 \times g$ por 10min.;
- Transferir o sobrenadante para outro microtubo de 2 mL cuidadosamente com as pontas das ponteiros cortadas e adicionar ao novo tubo 900 μL de Clorofórmio Álcool Isoamílico;
- Homogeneizar novamente por 10 min. repetindo-se após a centrifugação anterior;
- Transferir o sobrenadante para outro tubo de 1.5 mL utilizando-se as ponteiros com as pontas cortadas;
- Adicionar 600 μL de isopropanol e homogeneizar gentilmente;
- Centrifugar a $13800 \times g$ por 10 min.;
- Descartar o sobrenadante e adicionar 400 μL de NaCl 1M;

- Dissolver bem o sedimento passando-se o tubo no vortex e incubando em banho maria a 65⁰C;
- Adicionar Rnase a uma concentração final de 40 µg/mL e incubar a 37⁰C por 30 min.;
- Adicionar 800 µL de etanol 99.5 % e homogeneizar gentilmente;
- Centrifugar a 13800 x g por 10 min.;
- Descartar o sobrenadante e adicionar 500 µL de etanol 70 %;
- Descartar o sobrenadante e adicionar 60 µL de 1/10 tampão TE;
- Dissolver completamente o sedimento ;
- Armazenar em *freezer* -20⁰C;

6. Condições de PCR para Amplificação das construções *rd29A:DREB1A*, *rd29A:GUS* e *pAC321*.

6.1 Reação:

| Reagentes | Volume por Reação | Concentração Final |
|---------------------------|-------------------|--------------------|
| Água bidestilada | 17,55 μ L | --- |
| Tampão 10X | 2,5 μ L | 1X |
| MgCl ₂ (50 mM) | 0,75 μ L | 1,5 mM/ μ L |
| DNTP's (2,5mM) | 1,0 μ L | 2,5mM |
| Primer F (10 μ M) | 0,5 μ L | 5 μ M |
| Primer R (10 μ M) | 0,5 μ L | 5 μ M |
| Taq (5 U/ μ L) | 0,2 μ L | 1U |
| DNA (10 ng/ μ L) | 2,0 μ L | 20 ng |

6.2 Sequências dos primers:

| | |
|--------------|---|
| Ahas-1 | ACT AGA GAT TCC AGC GTC AC |
| Ahas-2 | GTG GCT ATA CAG ATA CCT GG |
| AtRd29Dreb-F | CCA ATA GAC ATG GAC CGA CTA CT |
| AtRd29Dreb-R | GTT CTC TAA CCT CAC AAA CCC ACT |
| NostProx | GTT TGA ACG ATC GGG GAA AT |
| 29AP5H | GGG AAG CTT GCC ATA GAT GCA ATT CAA TCA AAC T |
| GmRNAr18S-F | AAA CGG CTA CCA CAT CCA AGG |
| GmRNAr18S-R | CCT TCA ATG GAT CCA TCG TTA |

6.3 Condições de Ciclagem:

| | | |
|-------------------------------|---|-----------|
| 95 ⁰ C – 5 minutos | } | 35 ciclos |
| 95 ⁰ C – 1 minuto | | |
| 55 ⁰ C – 1 minuto | | |
| 72 ⁰ C – 2 minuto | | |
| 72 ⁰ C – 7 minutos | | |
| 4°C - forever | | |

7. Quantificação do DNA

- O DNA pode ser quantificado com o uso de espectrofotômetro. Devem ser feitas leituras em comprimentos de onda de 260nm. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a 50 ug/ul de DNA. A amostra de DNA deve ser diluída para se fazer a leitura, sendo que o ideal é que a absorbância fique entre 0,2 e 1.

$$\text{Concentração de DNA (ng/ul)} = \text{DO}_{260} \times \text{Fator de Diluição} \times 50 \text{ ug/ul}$$

- Para verificar a pureza do DNA, deve ser feita também a leitura a 280nm. A relação entre as leituras 260/280 nos dá uma indicação da pureza do DNA.

$$\text{Relação 260/280} = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

- Se a razão ficar entre 1,8 e 2,0 a absorção é provavelmente devido aos ácidos nucleicos. Uma razão menor que 1,8 indica que pode haver proteínas e/ou outras moléculas absorventes de UV na amostra. Uma razão superior a 2,0 indica que a amostra pode estar contaminada com clorofórmio ou fenol, e deve ser reprecipitado com etanol.

8. Gel de Poliacrilamida 10%

| Componentes | Volume final |
|--------------------------|--------------|
| Acrilamida-Bis (29:1) | 16mL |
| TAE 10x | 6,4mL |
| Água destilada | 41,6mL |
| Temed | 22,4 L |
| Persulfato de Amônio 10% | 448 L |

Usar luvas na preparação do gel.

9. Eletroforese em gel de agarose

Agarose 1,3%

TBE 1X

Fundir a Agarose no microondas. Esfriar até que suporte a temperatura na parte interna do antebraço.

Brometo de Etídio (10 mg/mL) 1% em relação ao volume de TBE

10. Ensaio com GUS

- Incubar o tecido no tampão de reação, em um volume suficiente para cobrir a amostra. Vedar o recipiente, para evitar a evaporação do tampão. Em geral, placas para ELISA (*microtiter plates*) ou tubos de microcentrífuga são bem apropriados.
- Incubar no escuro, a uma temperatura entre 25° e 37°C. Dependendo da atividade da GUS na amostra, a reação pode levar alguns minutos até 16 horas ou mais.
- Retirar o tampão de reação e adicionar etanol 70%, para interromper a reação e retirar a clorofila, permitindo melhor visualização da coloração azul. Observar as amostras ao microscópio estereoscópio.

11. Material de Laboratório Para Preparação de RNA Livre de Ribonuclease

- Luvas devem ser utilizadas em todos os trabalhos envolvendo RNA. Estas devem ser trocadas cada vez que tocarem em materiais ou equipamentos que outras pessoas tocaram sem luvas.
- Água livre de ribonuclease deve ser preparada adicionando-se dietil pirocarbonato (DEPC) a uma concentração final de 0,1% (V/V) a água bidestilada (ou equivalente). Depois de autoclavar durante uma hora abrir a autoclave rapidamente para deixar o vapor sair. A água DEPC tratada é então deixada overnight na autoclave (desligada, mas quente) para decompor o DEPC residual. Uma outra opção é ferver a água por pelo menos 30 min em uma tela de amianto. Depois que a água esfriar a uma temperatura de 25°C (morna), o cheiro da água é checado para se ter certeza de que não há traços de um odor doce, de açúcar, característico do DEPC. Se houver resquícios de DEPC, a água com DEPC tratado deve ser autoclavada novamente, ou fervida por 15 min ou mais. Todo DEPC deve ser eliminado da água, pois este altera a atividade enzimática. O DEPC deve ser manuseado com cuidado, usando luvas, máscara e manipulado em capela com exaustor sempre que possível, pois é inflamável e mutagênico.
- As soluções livres de ribonuclease são preparadas por tratamento com DEPC como descrito acima. Todas as soluções são autoclavadas por pelo menos trinta minutos. Autoclavando efetivamente inativa-se muitas classes de ribonucleases, as quais podem contaminar reagentes em quantidades evidentes.
- Soluções contendo o tampão Tris não podem ser efetivamente tratadas com DEPC, pois o Tris inativa o DEPC. Em adição, o acetato de amônio é relativamente volátil, com isso este também não deve ser autoclavado. Reagentes dessa natureza devem ser preparados utilizando água livre de ribonuclease. (água tratada com DEPC).

- Reagentes são removidos de suas fazes batendo gentilmente no recipiente de plástico que os contém. Uso de espátulas, misturadores magnéticos ou provetas são evitados, ao menos que sejam deixados em estufas de secagem a 25°C por pelo menos 4 horas para que as ribonucleases sejam degradadas.
- Recipientes de vidro e todos os utensílios de vidro devem também ser deixados em estufa de secagem por pelo menos 4 h a 37°C. As tampas dos recipientes devem ser incubadas em 0,1% (V/V) com água livre de DEPC por pelo menos 4 horas a 37°C. Depois disso as tampas devem ser repassadas para os recipientes e autoclavadas por 15 min para inativar o DEPC.
- Grande parte dos utensílios de plástico estéreis, incluindo tubos cônicos (Falcon) e pipetas, são relativamente livres de ribonucleases e assim são usadas sem nenhuma preparação especial.
- A ponta das pipetas são sempre autoclavadas antes de cada uso. Os utensílios de plástico utilizados são transferidos para recipientes livres de ribonucleases, tratados com DEPC e autoclavados. Utensílios de plástico e equipamentos que não podem ser autoclavados, são enxugados com Rnase AWAY (Invitrogen- Life Technologies) para remover as Rnases das superfícies.

12. Extração de RNA Usando TRIZOL (Pequena Escala)

Materiais:

- Centrífuga em 4 °C
- 8M LiCl (15 mL)
- Banho Maria em 55 °C
- 75% EtOH (20 mL)
- Nitrogênio Líquido
- Isopropanol (4 mL)
- TRIZOL (40 mL)
- 3M Acetato de Sódio (0,4 mL)
- Clorofórmio (8 mL)

ATENÇÃO: Todo trabalho com RNA tem de ser conduzido com o uso de luvas. As luvas devem ser trocadas toda vez que tocar superfícies/objetos que possam estar contaminados com RNAses.

01. Coloque o TRIZOL (1 mL x número de amostras) no Banho Maria a 55 °C.
02. Homogenize o tecido em nitrogênio líquido.
03. Coloque aproximadamente 0,1 g em tubo Eppendorf de 1,5 mL.
04. Adicione 1 mL de TRIZOL, centrifugue, vortex.
05. Agite, 1 min, centrifugue levemente somente para o tecido/Trizol ficar na parte inferior do tubo.
06. Incube em 55 °C, 2 min.
07. Coloque em gelo por 1,5 h.
08. Centrifugue a 15.000 rpm a 4 °C durante 20 min.
09. Enquanto ocorre a centrifugação coloque 200 µL de clorofórmio em um novo tubo para cada amostra.

10. Após a centrifugação coloque o sobrenadante no tubo com clorofórmio e descarte os resíduos.
11. Agite bem.
12. Incube a temperatura ambiente (22-25 °C) por 2 min.
13. Centrifugue a 15.000 rpm a 4 °C durante 30 min.
14. Coloque o sobrenadante em um novo tubo e adicione 1/3 do volume com LiCl 8M. (exemplo, se o volume do sobrenadante for 300 µL, adicione 100 µL LiCl 8M).
15. Agite bem.
16. Incube em freezer -80 °C por 1h.
17. Coloque os tubos por alguns minutos (1-3min) em banho maria de 40 °C para derreter a solução.
18. Centrifugue a 15.000 rpm em 4 °C por 30 min.
19. Remova cuidadosamente o sobrenadante tentando não agitar ou remover o pellet (o pellet contém o RNA); tente remover o máximo de sobrenadante sem trazer parte do pellet. Se necessário centrifugue novamente brevemente por 5 min para assentar o pellet e remover o sobrenadante. É preferível deixar que fique um pouco de sobrenadante do que remover o pellet.).
20. Descarte o sobrenadante.
21. Adicione 400 µL de 75% EtOH, e gire levemente o tubo para cima e para baixo.
22. Centrifugue a 15.000 rpm em 4 °C por 5 min.
23. Remova o sobrenadante (e descarte) completamente com muito cuidado sem remover partes do pellet.
24. Adicione ao pellet 100 µL de água MilliQ (autoclavada várias vezes).

25. Dissolva o pellet batendo levemente com o dedo na ponta do tubo. (OBS. Se o pellet demorar muito para dissolver adicione mais 100 μL de água MilliQ e dobre as quantidades também de Acetato de Sódio e Isopropanol do próximo passo)
26. Adicione 10 μL de Acetato de Sódio (3M) e 100 μL de Isopropanol, gire levemente para cima e para baixo.
27. Incube a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min.
28. Coloque em banho maria ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) por alguns minutos (1-3 min).
29. Centrifugue a 15.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.
30. Remova cuidadosamente o sobrenadante e adicione 400 μL de 70% EtOH).
31. Centrifugue a 15.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.
32. Remova o sobrenadante cuidadosamente (e descarte) e deixe o tubo com o pellet secando na bancada por 10 min.
33. Adicione 50 μL (ou 100 μL se o pellet demorar muito para dissolver) de água MilliQ e dissolva o pellet totalmente.
34. Aqueça a solução em $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min enquanto dissolve o pellet.
35. Quantifique e mantenha a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

13. Quantificação de RNA por espectrofotometria

- Ligar o aparelho e ligar a luz ultravioleta (de Deutério) e ajustar o espelho para esse tipo de luz.
- Zerar o aparelho com dois brancos. Deixar com branco no 1º espaço e no 2º espaço por a amostra.
- Diluição: 5µL RNA para 495µL de H₂O = 100 (fator de diluição).
- Fazer a leitura a 260, 280 e 320nm.
- Organizar leituras:

| Tratamentos | 260nm | 280nm | 320nm | [RNA 260nm] µg/µL | 260/280 |
|-------------|-------|-------|-------|-------------------|---------|
| Branco | | | | | |

T n

- $[RNA] = (leitura\ 260nm - 320nm) \times 40 \times 50$
- A absorvância da 280nm deve ser subtraída da leitura de branco em 280nm para calcular a relação 260/280. Esta relação dá uma ideia da qualidade do RNA, devendo estar entre 1,8 e 2,0. Resultados acima de 2,0 indicam contaminação com reagentes e abaixo de 1,8, contaminação com proteína ou DNA.
- A absorvância de 320nm também deva ser subtraída do branco 320nm para calcular a [RNA].

14. Eletroforese em gel de agarose 2% para RNA

- Pesar 1,4g agarose e adicionar 70mL TBE 1X (preparado com H₂O DEPC). Dissolver no microondas e resfriar.
- Adicionar 2μL de brometo de etídio e homogenizar.
- Na cuba e no pente passar produto que degrada RNase.

A partir das diluições, pipetar:

- 7μL de H₂O DEPC
- 1μL de RNA diluído
- 2μL de tampão de corrida
- Aplicar nos poços e correr a 90 volts por aproximadamente 1h.
- Essa corrida serve para verificar a integridade do RNA extraído.

15. Transcrição Reversa OligodT

- 5 μ L de RNA total;
- 2 μ L de primer oligodT (100 μ M);

Colocar no termociclador a 80°C por 3 min / Resfriar no gelo

- 6 μ L de tampão 5X first strand;
- 4 μ L de dNTP's (2,5mM);
- 4 μ L DTT (0,1M);
- 2 μ L da enzima transcriptase reversa (M-MLV) (200U/ μ L);
- 9 μ L de água MilliQ.

Colocar no termociclador a 37°C por 1 hora / 65°C por 10 min.

16. PCR em Tempo Real

16.1. Curva de eficiência

- fazer 3 ou 4 diluições do cDNA (10 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3});
- preparar reações, em triplicata, de PCR utilizando SYBR Green pra cada diluição de cDNA, incluindo um controle sem cDNA (NTC);
- incluir sempre o controle endógeno, que deve apresentar a mesma eficiência do gene alvo;
- montar a placa no computador, escolhendo um detector para cada gene a ser analisado;

A eficiência do gene é medida da seguinte fórmula: $E = 1 - [10^{-slope}]$, onde o *slope* indica a inclinação da reta, tendo que apresentar um valor próximo de $-3,4$. Após verificar a eficiência do gene, que deve ser acima de 95%, escolhe-se a diluição do cDNA adequada para preparar as reações da quantificação relativa.

16.1.2. Montagem da placa

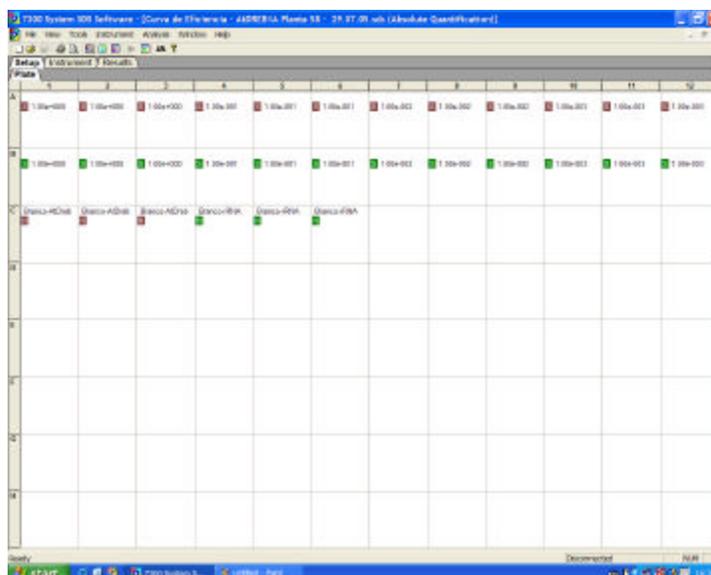


Figura 2: Placa montada para a curva de eficiência dos genes *AtDREB1A* e RNAr 18S.

16.1.3. Preparo da reação

- colocar 2 μL de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3});
- colocar 12,5 μL de SYBR Green;
- colocar 0,5 μL de ROX;
- colocar 8 μL de água milliQ

Dividir em 2 mix (69 μL cada mix);

- colocar 1 μL de *primer* Foward (5 μM);
- colocar 1 μL de *primer* Reverse (5 μM);

Dividir em 3 mix (25 μL cada mix).

16.2 Quantificação relativa

16.2.1. Montagem da placa

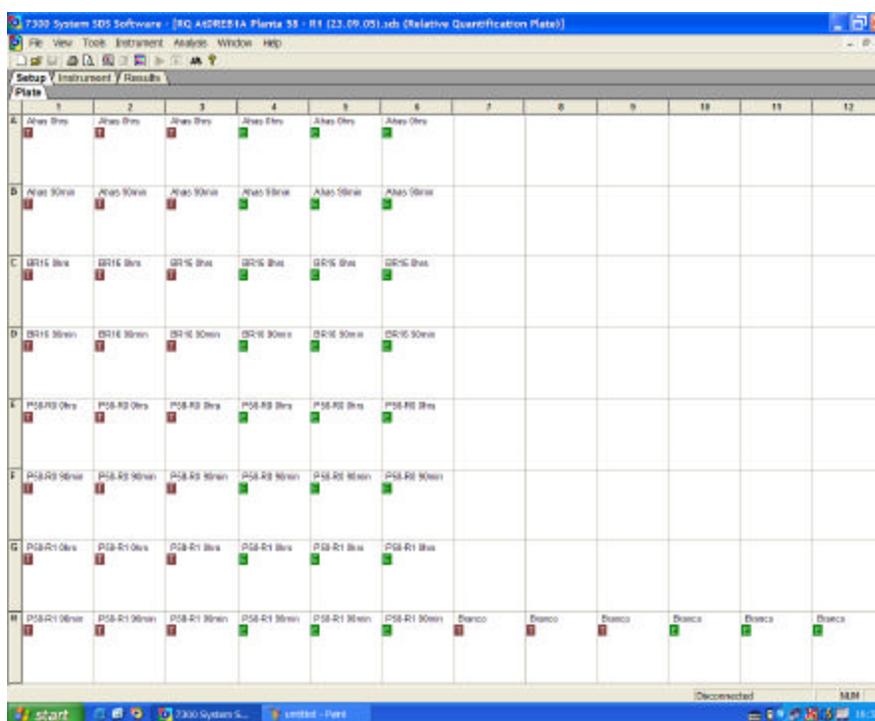


Figura 3: Placa montada para a quantificação relativa dos genes *AtDREB1A* e *RNAr 18S*.

16.2.2. Preparo da reação

- colocar 2 μL de cDNA;
- colocar 12,5 μL de SYBR Green;
- colocar 0,5 μL de ROX;
- colocar 8 μL de água milliQ

Dividir em 2 mix (69 μL cada mix);

- colocar 1 μL de *primer* Forward (5 μM);
- colocar 1 μL de *primer* Reverse (5 μM);

Dividir em 3 mix (25 μL cada mix).

16.3 Curva de dissociação

A curva de dissociação é feita para verificar se houve formação de dímeros de *primers* ou amplificação de produtos inespecíficos. O recomendado é que a temperatura de dissociação fique entre 82°C e 85°C.

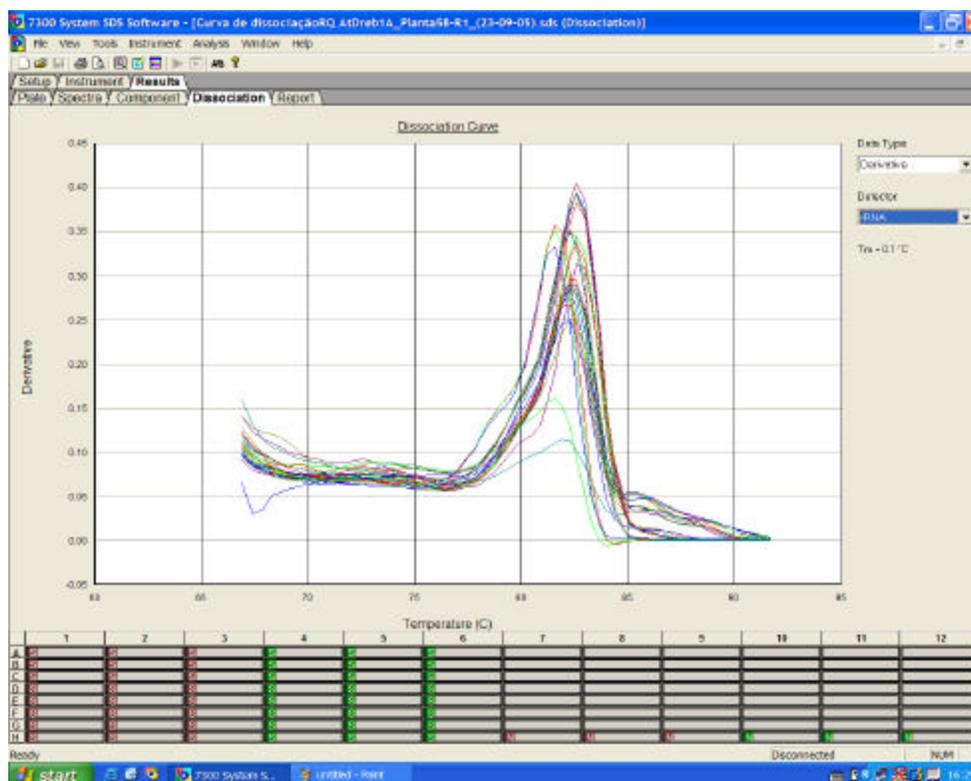


Figura 4: Curva de dissociação do gene RNAr 18S, usado como controle endógeno.

16.4 Cálculo do nível de expressão

A fórmula para o cálculo do nível de expressão é $RQ = 2^{-ddCt}$. Para cada tratamento é detectado o valor de Ct (Cycle threshold) tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor de Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Obtem-se então o valor de dCt. O valor de dCt dos tratamentos, agora, é subtraído do valor do dCt da amostra controle (calibrador), tendo-se o valor de ddCt. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

16.4.1 Análise dos resultados pelo *Sequence Detection Software*

- traçar o threshold, onde as curvas se apresentam paralelas entre si;
- considerar o ciclo de início em 3 e o final entre 15 e 17;
- analisar.

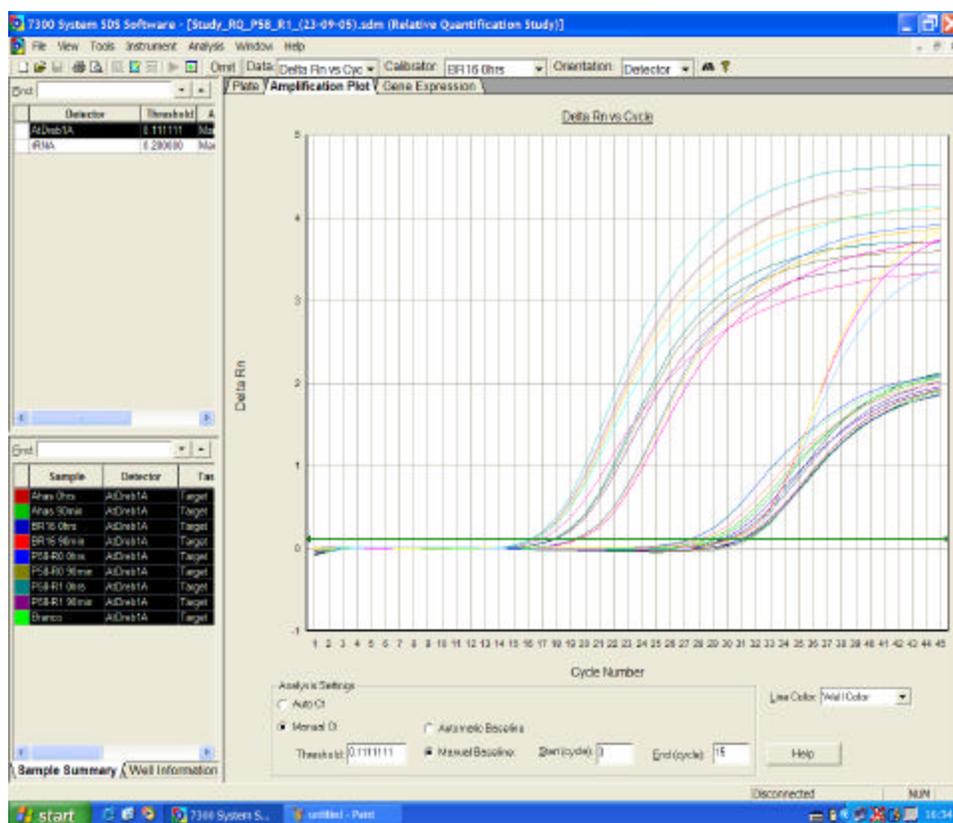


Figura 5: Curva de amplificação linear do gene *AtDREB*.

Anexo II – Meio de cultura e Soluções

1. Meio SOC

| | |
|--------------------------|-------------|
| Extrato de levedura 0,5% | 0,5g |
| Triptona 2% | 2,0g |
| NaCl 10mM | 1,0mL |
| KCl 2,5mM | 250 μ L |
| MgCl ₂ 10mM | 1,0mL |
| MgSO ₄ 10mM | 1,0mL |
| Glicose 20mM | 0,3604g |
| Água destilada | 96mL |

- Autoclavar.

2. Meio LB (*Lennox L Broth Base*) líquido

- Meio LB (triptona, extrato de levedura e NaOH) -20g para cada 1L de água destilada.
- Autoclavar.

3. Meio LB (*Lennox L Broth Base*) sólido

- Meio LB (triptona, extrato de levedura e NaOH) -20g para cada 1L de água destilada.
- Adicionar 12g para ágar bacteriológico para cada 1L de meio.
- Autoclavar.

4. Preparo de BAP (benzilaminopurina - 5 mg/mL)

- 0,0025 g de BAP
- 50 μ L NaOH
- 450 μ L água destilada
- Preparar no momento de usar.

5. Preparo de Vit B5 (solução estoque)

| | | | | | |
|------------------|---|-------------|-------------|--------------------------|---------|
| Ácido Nicotínico | → | 0,008 mM = | 1,0 mg/L = | 0,001 g/L X 100 = | 0,1 g/L |
| Piridoxina Hd | → | 0,0049 mM = | 1,0 mg/L = | 0,001 g/L X 100 = | 0,1 g/L |
| Tiamina Hd | → | 0,030 mM = | 10,0 mg/L = | 0,01 g/L X 100 = | 1,0 g/L |
| Myo-inositol | → | 0,55 mM = | 100 mg/L = | 0,1 g/L | |
| Sacarose | → | 58,4 mM = | 20,0 g/L = | 20,0 g/L | |

- Usar máscara e luvas. Completar para 1000 mL com água destilada.
- Aliquotar em tubos de 45 mL e armazenar a – 20 °C.

6. Imazapir (solução estoque) – 2,8 mg/mL

- 0,0028 g de Imazapir.
- 10 mL de água Mili-Q.
- Filtroesterilizar e aliquotar. Armazenar a -20 °C.

7. Espermidina 0,1M (SIGMA S-0266). (145,2 g/mol)

- Dissolver todo o conteúdo de um frasco (1g) em 68,8 mL de água destilada.
- Esterilizar por filtração (em filtros de 0,22 μm).
- Aliquotar em tubos de microcentrífuga. Os tubos devem ficar cheios para permitir contato mínimo da solução com o oxigênio atmosférico. Armazenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Para preparar 5 mL, pesar 0,0726 g de espermidina.

8. Glicerol 50% (v/v)

- Misturar partes iguais de glicerol e água destilada, autoclavar.
- Guardar à temperatura ambiente.

9. Meio MS + Phytigel ph 5,7 (para placas de suporte dos embriões)

- Sais MS (Gibco BRL) 1 sac/L (1 sac = 4,3 g)
 - 30 g de sacarose
 - Ajustar o pH para 5,7
 - 8 g de phytigel
-
- Para 200 mL (~ 20 placas pequenas; 1 placa pequena = 12-13 embriões)
 - 0,86 g de Sais MS (Gibco BRL)
 - 6 g de sacarose
 - Ajustar o pH para 5,7
 - 1,6 g de phytigel
-
- Autoclavar. Esfriar sob água corrente sem muita agitação para evitar a formação de espuma. Na câmara de Fluxo Laminar, distribuir o meio nas placas até mais ou menos a metade da altura delas. Após solidificar, armazenar em geladeira.

10. Meio MS + BAP e Vit B5 pH 5,7 (para indução ao multibrotamento)

- Sais MS (Gibco BRL) 1 sac/L
- 30 g de sacarose
- 500 µL de BAP
- Ajustar para pH 5,7
- 6 g de ágar

Para 500 mL (~ 10 placas; 1 placa = 100 embriões)

- 2,15 g de Sais MS (Gibco BRL)
- 15 g de sacarose
- 250 µL de BAP
- Ajustar para pH 5,7
- 3 g de ágar

Autoclavar. Esfriar sob água corrente sem muita agitação para evitar a formação de espuma. *Na câmara de Fluxo Laminar*, distribuir o meio nas placas até mais ou menos a metade da altura delas. Após solidificar, armazenar em geladeira.

OBS.: usar uma placa somente para controle.

11. Meio MS + Imazapir pH 5,7 (para a seleção dos embriões transformados)

- Sais MS (Gibco BRL) 1 sac/L (1 L = 28-30 copos; 1 copo = 10 embriões)
- 30 g de sacarose
- Ajustar para pH 5,7
- 8 g de ágar

Autoclavar. Esfriar sob água corrente sem muita agitação para evitar a formação de espuma.

Adicionar:

- 500 µL de ImZ (solução estoque)
- 10 mL de Vitamina B₅ (solução estoque)

Na câmara de Fluxo Laminar, distribuir nos copos até mais ou menos o dobro da base.

Após solidificar, armazenar em geladeira.

12. Meio MS para controle (sem adição de ImZ)

- Sais MS (Gibco BRL) 1 sac/L (1 L = 28-30 copos; 1 copo = 7 embriões)
- 30 g de sacarose
- Ajustar para pH 5,7
- 8 g de ágar

Autoclavar. Esfriar sob água corrente sem muita agitação para evitar a formação de espuma. *Na câmara de Fluxo Laminar*, distribuir nos copos até mais ou menos o dobro da base. Após solidificar, armazenar em geladeira.

OBS.: usar 14 embriões não-bombardeados para controle: 7 em um copo **MS/ImZ** e 7 em um copo **MS**.

13. Preparo da solução nutritiva

Solução de estoque

SOLUÇÃO A.....101,1 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 KNO_3 (1mol/L)
 (Nitrato de Potássio)

SOLUÇÃO B..... 236,15 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 mol/L)
 (Nitrato de Cálcio tetrahidratado)

SOLUÇÃO C.....115,03 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 mol/L)
 (Fosfato de Amônio monobásico)

SOLUÇÃO D.....246,48 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mol/L)
 (Sulfato de Magnésio heptahidratado)

SOLUÇÃO E

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,724 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Cloreto de Manganês)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$0,080 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Sulfato de Cobre II)

H_3BO_3 2,860 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Ácido Bórico)

MoO_30,017 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Molibdênio Trióxido) (Anidrido Molíbdico)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,220 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Sulfato de Zinco Heptahidratado)

SOLUÇÃO F.....4,47 g para 1L SOLUÇÃO ESTOQUE
 (Fe EDTA)

Preparo da solução de uso

SOLUÇÃO A.6 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
KNO₃ (1mol/L)
(Nitrato de Potássio)

SOLUÇÃO B.4 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
Ca(NO₃)₂.4H₂O (1 mol/L)
(Nitrato de Cálcio tetrahidratado)

SOLUÇÃO C.2 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
NH₄H₂PO₄ (1 mol/L)
(Fosfato de Amônio monobásico)

SOLUÇÃO D.2 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
MgSO₄.7H₂O (1 mol/L)
(Sulfato de Magnésio heptahidratado)

SOLUÇÃO E.1 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
MnCl₂.4H₂O
(Cloreto de Manganês)
CuSO₄.5H₂O
(Sulfato de Cobre II)
H₃BO₃
(Ácido Bórico)
MoO₃
(Molibdênio Trióxido) (Anidrido Molíbdico)
ZnSO₄.7H₂O
(Sulfato de Zinco Heptahidratado)

SOLUÇÃO F.1 mL para 1L SOLUÇÃO NUTRITIVA
(Fe EDTA)

14. Preparo do tampão EB-PCR para extração de DNA (Edwards et al., 1991)

| Reagentes | Concentração Final | Volume (10 mL) |
|--------------------|---------------------------|-----------------------|
| Tris-HCL 1M pH 7,5 | 200 mM | 2,0 ìL |
| NaCl 5 M | 250 mM | 500 ìL |
| EDTA 0,5 M | 25 mM | 500 ìL |
| SDS 10 % | 0,5 % | 500 ìL |
| Água Destilada | ---- | 6,5 ìL |

15. Preparo do Tampão de extração utilizando CTAB (Keim et. al, 1988):

| Componentes | Concentração Final | Vol. Final (10 mL) |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| CTAB 5 % | 1 % | 2,0 mL |
| NaCl 5M | 1,4 M | 2,8 mL |
| Tris-HCl 1M ph 8,0 | 100 mM | 1,0 mL |
| EDTA 0,5 M | 20 mM | 0,4 mL |
| Mercaptoetanol | 0,1 % | 0,01 mL |
| Água | | 3,7 mL |

16. Cloreto de Magnésio 50mM

- 50 μ l MgCl₂ 1M
- 950 μ l água MilliQ[®]

17. dNTP's 2,5mM

- 25 μ l de cada nucleotídeo
- 900 μ l de água MilliQ[®]

18. CaCl₂ 2,5 M

- Dissolver 3,675 g de CaCl₂.2H₂O em 10 mL de água destilada).
- Autoclavar e aliquotar em tubos de microcentrífuga.
- Armazenar em geladeira.

19. Tampão de Reação 10X

- 100mM Tris-HCl pH 8,3 (100 μ l tris-HCl 1M pH 8,3)
- 500mM Cloreto de Potássio (500 μ l KCl 1M)
- 400 μ l água MilliQ[®]

20. TE pH 8,0

- 10mM Tris-HCl pH 8,0 (500ul Tris-HCl 1M pH 8,0)
- 1mM EDTA pH 8,0 (100ul EDTA 0,5M pH 8,0)
- Completar com água MilliQ[®] para 50 ml

21. Tampão para RNase A

- 10mM Tris-HCl pH 7,5
- 15mM NaCl

22. Tampão de amostra – 40% sacarose

- 4g sacarose
- 0,025g de azul de bromofenol
- Solubilizar a sacarose em 10mL de água destilada. Acrescentar o azul de bromofenol e agitar. Manter em geladeira.

23. Brometo de etídeo Solução de Brometo de Etídeo (10 mg/mL)

- 0,1g de Brometo de Etídeo
- 10mL de água destilada
- Armazenar em local escuro e manipular com luvas.

24. Solução de Brometo de Etídio para corar gel

- 40uL de Brometo de Etídio 10mg/mL
- 800mL de água
- Manter o gel mergulhado na solução de brometo de etídio sob agitação lenta por 20 minutos, retirar o gel e transferir para recipiente contendo água e manter sob agitação lenta por 5 minutos, para descorar, retirando o excesso de brometo.

25. Solução de acrilamida 40% (29:1)

Solução 40% - 40g de acrilamida + bis-acrilamida em 100mL de água

Em 40g, adicionar 29 parte de acrilamida e 1 parte de bis-acrilamida:

- 36,67g de acrilamida
- 1,33g de bis-acrilamida
- Em um becker, pesar a acrilamida e a bis-acrilamida, adicionar 50 mL de água destilada, colocar no agitador com aquecimento para dissolver. Em um balão volumétrico, completar com o volume para 100mL com água destilada.

26. Solução de persulfato de amônio 10%

- 0,15g de persulfato de amônio
- 1,5mL de água destilada

27. TAE (10X):

- 48,40g tris base
- 11,42mL ácido acético
- 20mL EDTA (0,5M pH 8,0)
- Completar com água para volume final de 1L.

28. TBE (10X)

- 108g Tris base
- 55g ácido bórico
- 40mL EDTA (0,5 M pH 8,0)
- Completar com água destilada para o volume final de 1L.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)