

HIGH TEMPERATURES ON ROOT GROWTH AND LIGNIFICATION OF TRANSGENIC GLYPHOSATE-RESISTANT SOYBEAN

ALTAS TEMPERATURAS, CRECIMIENTO Y LIGNIFICACIÓN DE SOYA TRANSGÉNICA RESISTENTE AL GLIFOSATO

P. da Costa Zonetti^{1*}, L. Sayuri Suzuki², E. Aparecida Bonini³, M. L. Lúcio Ferrarese³, Osvaldo Ferrarese-Filho³

¹Federal University of Paraná, UFPR, Campus Palotina. Av. Pioneiro, 2153, 85.950-000 Palotina-PR, Brazil. Fax: +55 44 3649 6616. (patriciazonetti@ufpr.br). ²Embrapa Dairy Cattle. Rua Eugênio do Nascimento, 610-Dom Bosco, 36038-330, Juiz de Fora-MG, Brazil. (lsuzuki@cnpqgl.embrapa.br). ³State University of Maringá. Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, 87020-900, Maringá-PR, Brazil, (oferrarese@uem.br).

ABSTRACT

Glyphosate resistant transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] expresses a glyphosate insensitive EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase). This enzyme is involved in important secondary metabolism pathways, including lignin biosynthesis. Thus, differences in lignin content and growth between susceptible (OC14) and glyphosate-resistant soybean may be observed. The objective of this study was to evaluate differences between growth and lignin content of roots in transgenic and OC14 soybean cultivated at high temperatures. Seeds from the OC14 soybean and its transgenic cultivar, CD213RR, were germinated at 25, 27.5, 30 and 32.5 °C. After 3 d, seedlings were cultivated in Hoagland half-strength nutrient solution during 12 h photoperiods and at the same germination temperature. After 4 d, roots' relative length, fresh and dry biomass, and lignin content were determined. Increasing temperatures promoted root growth. There was decreased growth and higher lignin content in roots in CD213RR soybean as compared to OC14. The transgenic soybean may present a different lignin metabolism since it showed higher lignification independently of temperatures, which is important because can be associated to a higher tolerance to drought and heat, but also with impaired growth and higher susceptibility to breakage of the stem.

Key-words: glyphosate, abiotic stress, *Glycine max*, plants, climatic changes.

RESUMEN

La soya transgénica [*Glycine max* (L.) Merrill] resistente al glifosato presenta glifosato EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa) insensible. Esta enzima participa en procesos importantes del metabolismo secundario, como la biosíntesis de la lignina. Así, se pueden observar diferencias en el contenido de lignina y crecimiento entre la soya susceptible (OC14) y la resistente al glifosato. El objetivo de este estudio fue evaluar las diferencias entre el crecimiento y el contenido de lignina de las raíces de la soya transgénica y la OC14, cultivadas con temperaturas altas. Las semillas de la soya OC14 y su cultivo transgénico, CD213RR, germinaron a 25, 27.5, 30 y 32.5 °C. Después de 3 d, las plántulas se cultivaron en una solución de nutrientes Hoagland de fuerza media, durante fotoperíodos de 12 h y a la misma temperatura de germinación. Después de 4 d se determinó la longitud relativa de las raíces, la biomasa fresca y seca, y el contenido de lignina. Las temperaturas cada vez más altas promovieron el crecimiento radicular. Hubo una disminución de crecimiento y mayor contenido de lignina en las raíces de la soya CD213RR en comparación con OC14. La soya transgénica puede presentar un metabolismo de la lignina diferente, ya que mostró lignificación mayor independientemente de la temperatura, lo cual es importante porque puede estar relacionado con la tolerancia mayor a la sequía y al calor, pero también con el retraso del crecimiento y mayor susceptibilidad a la rotura del tallo.

Palabras clave: glifosato, estrés abiótico, *Glycine max*, plantas, cambios climáticos.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos de soya [*Glycine max* (L.) Merrill] son importantes en Brasil, el segundo productor mundial, después de los EE.UU. En la

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: Noviembre, 2011. Approved: Julio, 2012.

Published as NOTE in *Agrociencia* 46: 557-565. 2012.

INTRODUCTION

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crops are prominent in Brazil, the second largest soybean producer after the US. For the 2010/2011 harvest, there were 23.6 million ha with soybean, the production was 75.3 million t with an average productivity of 3050 kg ha⁻¹ (Embrapa, 2010; Conab, 2011).

The patterns of seed germination and plant development are genetically programmed and this expression can be changed by environmental factors during cultivation (Santos *et al.*, 1992). Some soybean cultivars show their optimum growth between 25 and 30 °C (Miyasaka and Medina, 1981) because temperatures higher than 30 °C can modify cell membranes stability affecting several metabolic processes, particularly photosynthesis and cellular respiration (Nagarajan *et al.*, 2005). Besides, modifications in the average temperature or rainfall may impact growth and development (Challinor and Wheeler, 2008). Abiotic stress changes primary and secondary metabolism of the plants as a protection response, whereas changes in the secondary metabolism include phenylpropanoids pathway, the main route for synthesizing phenolic compounds and lignin (Dixon and Paiva, 1995; Cabane *et al.*, 2012).

The most abundant class of phenolic compounds in plants is the derivative from phenylalanine. Through the elimination of an ammonia molecule, phenylalanine is converted into cinnamic acid and this reaction is catalyzed by phenylalanine ammonia lyase (PAL) which operates at a branching point between the primary and secondary metabolisms. Production of lignin, coumarins, benzoic acid derivatives, anthocyanins, isoflavones, tannins and other flavonoids starts with phenylalanine (Vogt, 2010). Lignins are complex phenolic polymers deposited in cell walls, making them rigid and impervious. In addition to developmentally programmed deposition of lignin, its biosynthesis can also be induced by various biotic and abiotic stress conditions (Vanholme *et al.*, 2010; Cabane *et al.*, 2012). The incorporation of lignin in cell walls leads to structural rigidity and resistance of plant tissues (Polle *et al.*, 1994; Boudet *et al.*, 2003), because the thickening mechanism decreases the extensibility of the cell wall due to the formation of diphenyl bridges between wall polymers due to peroxidase enzymes

cosecha 2010/2011, hubo 23.6 millones ha de soya, con una producción de 75.3 millones de t, y una productividad promedio de 3050 kg ha⁻¹ (Embrapa, 2010; Conab, 2011).

Los patrones de germinación de semillas y desarrollo de la planta están programados genéticamente y pueden experimentar cambios debido a factores ambientales durante el cultivo (Santos *et al.*, 1992). Algunos cultivares de soya muestran un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C (Miyasaka y Medina, 1981), ya que las temperaturas superiores a 30 °C pueden modificar la estabilidad de las células de las membranas, lo cual afecta varios procesos metabólicos, en particular la fotosíntesis y la respiración celular (Nagarajan *et al.*, 2005). Además, los cambios en la temperatura media y las precipitaciones pueden afectar el crecimiento y el desarrollo (Challinor y Wheeler, 2008). El estrés abiótico cambia el metabolismo primario y secundario de las plantas como una respuesta de protección, mientras que los cambios en el metabolismo secundario incluyen la vía de los fenilpropanoides, la principal ruta para sintetizar compuestos fenólicos y la lignina (Dixon y Paiva, 1995; Cabane *et al.*, 2012).

La clase más abundante de los compuestos fenólicos en plantas es el derivado de la fenilalanina. A través de la eliminación de una molécula de amoníaco, la fenilalanina se convierte en ácido cinámico y esta reacción es catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL), que opera en un punto de ramificación entre los metabolismos primario y secundario. La producción de lignina, cumarinas, derivados del ácido benzoico, antocianinas, isoflavonas, taninos y otros flavonoides comienza con la fenilalanina (Vogt, 2010). Las ligninas son polímeros fenólicos complejos depositados en las paredes celulares, que las hace rígidas e impermeables. Además del depósito del desarrollo programado de la lignina, su biosíntesis se puede inducir por diversas condiciones de estrés biótico y abiótico (Cabane *et al.*, 2012; Vanholme *et al.*, 2010). La incorporación de la lignina en las paredes celulares conduce a la rigidez estructural y resistencia de los tejidos vegetales (Polle *et al.*, 1994; Boudet *et al.*, 2003), debido a que el mecanismo de engrosamiento disminuye la extensibilidad de la pared celular debido a la formación de puentes de difenilo entre los polímeros de las paredes, por las enzimas peroxidasa (Sánchez *et al.*, 1996). El aumento de las temperaturas del suelo cerca de 45 °C puede mejorar la biosíntesis de la lignina (Brenbrook, 2001).

(Sanchez *et al.*, 1996). Increasing soil temperatures close to 45 °C might enhance lignin biosynthesis (Brenbrook, 2001).

Genetically modified soybean, resistant to glyphosate (Roundup Ready™ or RR cultivar), expresses a variant of EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) with low affinity to glyphosate, giving the plant resistance to this herbicide (Harrison *et al.*, 1996; Von Pinho, 2002). This enzyme acts in the shikimic acid pathway leading to synthesis of lignin, phenylalanine and tyrosine (Steinrücken and Amrhein, 1980).

High temperatures may affect plants by increasing deposition of lignin in cell walls and decreasing synthesis of essential aromatic amino acids, thus reducing plant growth. In this context, evaluating growth and lignin content in roots of transgenic RR and conventional soybean at high temperatures may show differences in their metabolism. This information may explain differential developmental responses of these cultivars in crop systems.

Considering that RR soybean has a variant of an EPSPS belonging to the shikimate pathway which is active in plants under adverse temperature conditions, the hypothesis of this study was that susceptible (OC14) and transgenic (CD213RR) soybean cultivars grown at high temperatures would differ in root growth and lignin content. The objective of this study was to evaluate the growth and lignification of CD213RR and OC14 soybean roots, grown under high temperatures.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted in B.O.D chambers (Tecnal TE 400, Brasil), at the Plant Biochemistry Laboratory, State University of Maringá, Paraná, Brazil. Soybean seeds of CD213RR (glyphosate-resistant) and OC14 cultivars were supplied by COODETEC (Cascavel, Brazil); presence of CP4EPSPS gene in CD213RR was analyzed by PCR.

Soybean seeds were surface-sterilized with 2 % sodium hypochlorite for 3 min and rinsed with deionized water. Seeds were dark-germinated in rolls of three sheets of moistened germination paper and conditioned in flasks containing enough water to maintain moisture. Rolls were kept in a dark chamber (Tecnal TE 400, Brasil) at 80 % relative humidity and 25 °C (control), 27.5, 30 or 32.5 °C. After 3 d of germination seedlings were placed in a system with 25 three-day-old seedlings of uniform size, on an adjustable acrylic plate placed into a glass

La soya genéticamente modificada, resistente al glifosato (Roundup Ready™ o cultivar RR), expresa una variante de la EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-sintasa de fosfato) con afinidad baja al glifosato, lo que da a la planta resistencia a este herbicida (Harrison *et al.*, 1996; Von Pinho, 2002). Esta enzima actúa en la vía del ácido shikímico que conduce a la síntesis de la lignina, fenilalanina y tirosina (Steinrücken y Amrhein, 1980).

Las temperaturas altas pueden afectar a las plantas al aumentar el depósito de lignina en las paredes celulares y al reducir la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales, reduciendo así el crecimiento de las plantas. En este contexto, la evaluación del crecimiento y el contenido de lignina en las raíces de la soya, transgénica RR y convencional, a altas temperaturas puede mostrar diferencias en su metabolismo. Esta información puede explicar las diferentes respuestas en el desarrollo de estos cultivares en los sistemas de cultivo.

Dado que la soya RR tiene una variante de una EPSPS que pertenece a la vía del shikimato, que es activa en las plantas en condiciones adversas de temperatura, la hipótesis de este estudio fue que los cultivares de soya susceptibles (OC14) y transgénicos (CD213RR) sometidos a temperaturas altas, difieren en el crecimiento de la raíz y el contenido de lignina. El objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y la lignificación de las raíces de la soya CD213RR y la OC14, que se cultivan a temperaturas elevadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron en cámaras BOD (Tecnal TE 400, Brasil), en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Universidad Estatal de Maringá, Paraná, Brasil. Las semillas de soya CD213RR (resistentes al glifosato) y los cultivares OC14 fueron suministrados por COODETEC (Cascavel, Brasil); la presencia del gen CP4EPSPS en CD213RR fue analizada por PCR.

Las semillas de soya se esterilizaron 3 min en la superficie con hipoclorito de sodio al 2 % y se enjuagaron con agua desionizada. Las semillas germinaron en la oscuridad, en rollos de tres hojas de papel de germinación, humedecidos y acondicionados en frascos que contenían suficiente agua para mantener la humedad. Los rollos se mantuvieron en una cámara oscura (Tecnal TE 400, Brasil) a 80 % de humedad relativa y 25 °C (testigo), 27.5, 30 o 32.5 °C. Después de 3 d de germinación, las plántulas se colocaron en un sistema con 25 plántulas de tamaño uniforme y 3 d de

container (10×16 cm) filled with 200 mL of half-strength Hoagland's solution (Ferrarese *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004). This nutrient solution was treated with 17 mM potassium buffer, adjusted to pH 6.0 and monitored over time. The container was kept in a growth chamber, at 80 % relative humidity, 12 h light photoperiod, $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) irradiance at 25, 27.5, 30 or 32.5 °C. Cultivation lasted 96 h and the nutrient solution was replaced daily.

After cultivation, tap roots relative length, fresh and dry roots biomass and root lignin content were evaluated. Tap roots relative length was obtained by the difference between roots length before and after seedlings cultivation in each temperature tested. Next, roots were cut, carefully blotted with an absorbent paper and fresh weight was measured. Dry root weight was determined after oven-drying at 80 °C until reaching constant weight. Lignin content of roots was determined by the thioglycolic method (Chen *et al.*, 2000; Ferrarese *et al.*, 2002): cell wall extraction, acidic digestion, lignothioglycolic acid (LTGA) extraction and using UV spectrophotometer.

The experimental design was completely randomized with a factorial (2 cultivars × 4 temperatures of cultivation) arrangement of treatments with four replicates and each replicate contained 25 seedlings. Data were analyzed using ANOVA and means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Time factor was analyzed by a polynomial regression analysis for each cultivar. Sisvar software (Ferreira, 2006), was used for data analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Tap root relative length, roots biomass and lignin content showed significant differences between cultivars (Table 1). The relative length of tap roots was higher for OC14 soybean compared to CD213RR, only at 27.5 °C. Fresh and dry biomass at 27.5 and 30 °C and fresh biomass at 32.5 °C showed higher significant values for OC14. In all the temperatures, CD213RR soybean presented higher lignification than OC14. In general, the slower growth of the root system in CD213RR soybean may be due to the higher root lignification of this cultivar, at the four temperatures.

As the temperature increased there was a linear increase in fresh biomass of the root system of OC14 soybean: for each increase of 2.5 °C the increment was 0.0100 g (Figure 1). Besides, for dry biomass, the same cultivar showed a quadratic response and the maximum point of the fitted equation was 28.98 °C (Figure 2). In CD213RR soybean there was a decrease in growth of the fresh root system at 27.5 °C,

edad, en una placa de acrílico ajustable colocada en un recipiente de vidrio (10×16 cm), rellena con 200 mL de una solución Hoagland de fuerza media (Ferrarese *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004). Esta solución nutritiva se trató con un amortiguador de potasio de 17 mM, ajustado a un pH de 6.0 y monitoreado. El recipiente se mantuvo en una cámara de crecimiento, a 80 % de humedad relativa, durante un fotoperiodo de 12 h de luz, $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) irradiancia a 25, 27.5, 30 o 32.5 °C. El cultivo duró 96 h cambiando la solución nutritiva cada día.

Después del cultivo se midió la longitud relativa de las raíces primarias, la biomasa fresca y seca de las raíces y su contenido de lignina. La longitud relativa de las raíces primarias se obtuvo por la diferencia entre la longitud de las raíces antes y después del cultivo de las plántulas, bajo cada nivel de temperatura probado en este estudio. Luego se cortaron las raíces, se secaron cuidadosamente con papel absorbente y se midió el peso fresco.

La biomasa seca de la raíz se determinó después del secado en horno a 80 °C, hasta peso constante. El contenido de lignina de las raíces se determinó con el método tioglicólico (Chen *et al.*, 2000; Ferrarese *et al.*, 2002): extracción de la pared celular, digestión ácida, extracción del ácido lignotioglicólico (LTGA) y uso de un espectrofotómetro UV.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos (2 cultivares × 4 temperaturas de cultivo), con cuatro repeticiones y cada una con 25 plántulas. Los datos fueron analizados con ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El factor tiempo se analizó con un análisis de regresión polinomial para cada cultivar. Se usó el software Sisvar (Ferreira, 2006) para el análisis de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hubo diferencias significativas entre los cultivares en relación a la longitud relativa de la raíz primaria, la biomasa de la raíz y su contenido de lignina (Cuadro 1). La longitud relativa de las raíces primarias fue mayor para la soya OC14 comparada con la CD213RR, sólo a 27.5 °C. La biomasa fresca y seca a 27.5 y 30 °C y la biomasa fresca a 32.5 °C mostraron valores mayores significativos para OC14. En todas las temperaturas, la soya CD213RR presentó una mayor lignificación que la OC14. En general, el crecimiento más lento del sistema radicular en CD213RR puede deberse a la mayor lignificación de las raíces en este cultivar, con las cuatro temperaturas.

Al aumentar la temperatura hubo un aumento lineal en la biomasa fresca del sistema de raíces de la OC14; en cada aumento de 2.5 °C, el incremento fue 0.0100 g (Figura 1). Además, en la biomasa

Table 1. Transgenic glyphosate-resistant soybean CD213RR and susceptible OC14 soybean cultivated at four temperatures. Cuadro 1. Soya CD213RR transgénica resistente al glifosato y soya OC14 susceptible cultivada a cuatro temperaturas.

Variables	Temperature				
	Cultivar	25.0 °C	27.5 °C	30.0 °C	32.5 °C
Root relative length (cm)	OC14	17.37 a	19.72 a	17.90 a	18.30 a
	CD213RR	17.67 a	15.57 b	16.55 a	17.57 a
Fresh biomass (g)	OC14	0.126 a	0.141 a	0.184 a	0.195 a
	CD213RR	0.107 a	0.048 b	0.097 b	0.140 b
Dry biomass (g)	OC14	0.0070 a	0.0085 a	0.0157 a	0.0113 a
	CD213RR	0.0065 a	0.0027 b	0.0057 b	0.0085 a
Lignin, (mg LTGA g ⁻¹ root)	OC14	15.91 b	25.28 b	24.10 b	24.47 b
	CD213RR	22.45 a	29.18 a	31.39 a	29.22 a

Variables mean with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Las medias de las variables con letras diferentes en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

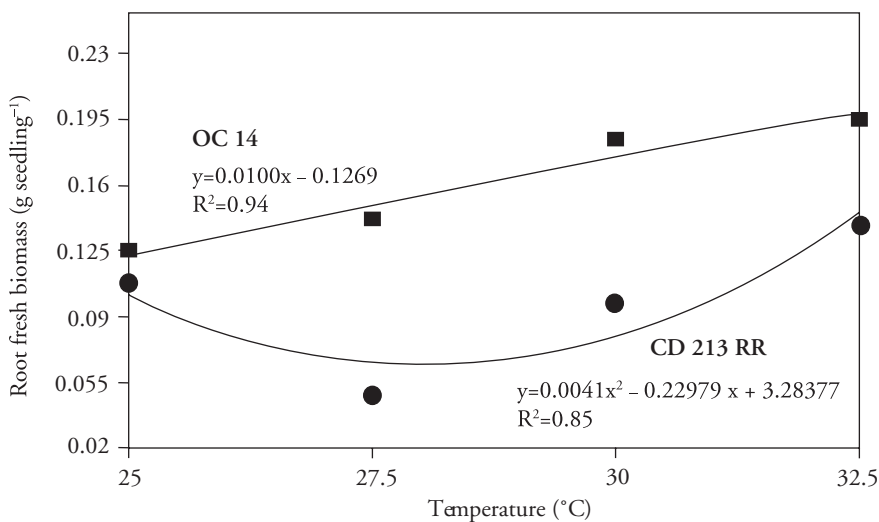


Figure 1. Seedlings root fresh biomass (g) of the transgenic soybean CD213RR (●) and the susceptible soybean OC14 (■) after 96 h of cultivation in nutrient solution, at four temperatures.

Figura 1. Biomasa fresca de la raíz de plántulas (g) de la soya transgénica (●) CD213RR y la susceptible OC14 (■), después de 96 h de cultivo en solución nutritiva y cuatro temperaturas.

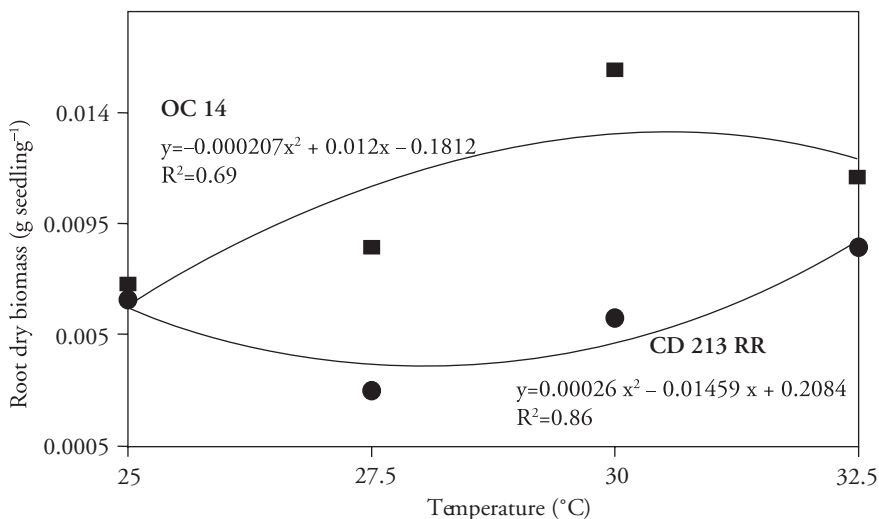


Figure 2. Seedlings root dry biomass (g) of the transgenic soybean CD213RR (●) and the susceptible soybean OC14 (■) after 96 h of cultivation in nutrient solution, at four temperatures.

Figura 2. Biomasa seca de la raíz de plántulas (g) de la soya transgénica (●) CD213RR y la susceptible OC14 (■), después de 96 h de cultivo en solución nutritiva y bajo cuatro temperaturas.

with a minimum (0.064 g) at 28.02 °C, obtained by mathematical inference, and an increment at 30 and 32.5 °C (Figure 1). The same behavior was observed with the dry biomass of this cultivar, where the minimum point was 28.06 °C, obtained by mathematical inference, with an increment at 30 and 32.5 °C (Figure 2).

Both cultivars presented better growth of the root system at temperatures close to 30 °C, which may be due to the fact that temperatures between 25 and 30 °C are optimal for growth and development of most soybean cultivars in Brazil (Embrapa, 2010). Soybean cultivars adapted to colder climates may present a different behavior, since a temperature increase from 26 to 30 °C throughout the growing season reduced seed size, and any stress related to evaporative demand in addition to high temperatures may be involved in this effect (Tacarindua *et al.*, 2012).

The analysis of lignin content (Figure 3) in both cultivars showed a significant quadratic equation, and a higher lignin content when exposed to temperatures above 25 °C. Higher temperatures increase evaporative demand and may cause tissue thickening as a consequence of enhanced lignin biosynthesis. This may be observed when plants are exposed to abiotic stresses such as drought and excess UV-B radiation, which often are associated to high temperatures (Cabane *et al.*, 2012; Tacarindua *et al.*, 2012). There was increased lignin biosynthesis but reduced growth in *Citrullus lanatus* roots, and it was associated with drought resistance (Yoshimura *et al.*, 2008).

seca, el mismo cultivar mostró una respuesta cuadrática y el punto máximo de la ecuación ajustada fue 28.98 °C (Figura 2). En CD213RR, hubo una disminución en el crecimiento del sistema de raíces frescas, a 27.5 °C, con un mínimo (0.064 g) a 28.02 °C, obtenido por la inferencia matemática, y un incremento en 30 y 32.5 °C (Figura 1). El mismo comportamiento se observó con la biomasa seca de este cultivar, donde el punto mínimo fue 28.06 °C, obtenido por la inferencia matemática, con un incremento a 30 y 32.5 °C (Figura 2).

Ambos cultivares mostraron mejor crecimiento del sistema radicular a temperaturas cercanas a 30 °C, lo cual puede deberse a que las temperaturas entre 25 y 30 °C son óptimas para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de los cultivares de soya en Brasil (Embrapa, 2010). Los cultivares de soya adaptados a climas más fríos pueden presentar un comportamiento diferente, ya que un aumento de temperatura de 26 a 30 °C durante la temporada de crecimiento redujo el tamaño de la semilla de soya, debido al estrés relacionado con demanda de evaporación, sumado a las altas temperaturas (Tacarindua *et al.*, 2012).

El análisis del contenido de lignina (Figura 3) en ambos cultivares mostró una ecuación cuadrática significativa y un mayor contenido de lignina al estar expuestos a temperaturas superiores a 25 °C. Las temperaturas más altas aumentan la demanda de evaporación y pueden causar un engrosamiento del tejido por una mayor biosíntesis de lignina. Esto se observa cuando las plantas están expuestas a estreses abióticos como la sequía y el exceso de radiación

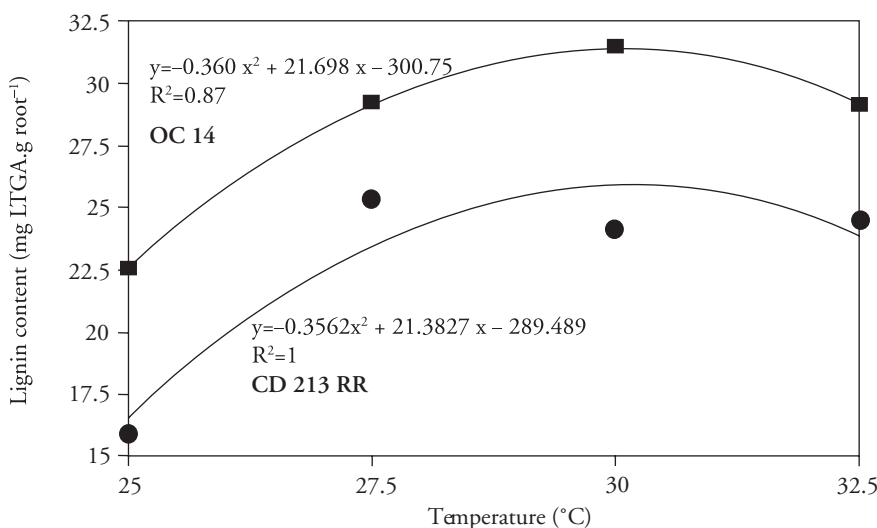


Figure 3. Root lignin content of the transgenic soybean CD213RR (●) and the susceptible soybean cultivar OC14 (■) after 96 h of cultivation in nutrient solution, at four temperatures.

Figura 3. Contenido de lignina en la raíz de la soya transgénica CD213RR (●) y en el cultivar de soya susceptible OC14 (■) después de 96 h de cultivo en solución nutritiva y cuatro temperaturas.

The maximum lignin content was observed close to 30 °C, with 34.65 and 26.19 mg LTGA g⁻¹ for CD213RR soybean and the conventional OC14 soybean. Lignin content at 30 °C in CD213RR was approximately 31 % higher than that of the OC14; besides, in warmer climates, lignin content of this soybean is around 20 % higher than in conventional soybean (Coghlan, 1999). Consequences of a higher lignification include more rigidity and strength of the stem; besides, lignin waterproofs the cell wall (Boerjan *et al.*, 2003) and may generate plants more resistant to drought but also with a higher susceptibility to stem breakage.

Transgenic plants may show changes in lignin amount, composition, primary structure and phenotypic effects by altering the expression of a single gene (Zobiolo *et al.*, 2010). According to Padgett *et al.* (1995) and Facchini *et al.* (2000), transgenic and conventional soybeans present differences in the composition of several metabolites, including aromatic amino acids; one of the transgenic soybeans contained lower levels of phenylalanine than the conventional line. A similar situation was observed in corn regarding tyrosine (Sidhu *et al.*, 2000). Phenylalanine and tyrosine are important for plant development as precursor molecules for the phenylpropanoids pathway and the main pathway for synthesis of phenolic compounds, including monolignols which are precursors of lignin (Strack, 1997).

Thus, it is reasonable to assume that differences in metabolites composition in transgenic soybeans could be associated to the expression of a variant of EPSPS, thus enhancing lignin content. This is an important feature as it can be associated to a higher drought and heat tolerance, but also with impaired growth and higher susceptibility to stem breakage.

CONCLUSIONS

The analysis of the results indicated that CD213RR and OC14 soybeans are adapted to higher temperatures but CD213RR showed reduced root growth and higher lignification, which could be associated to the expression of a variant of EPSPS and is an intrinsic feature of transgenic soybean.

UV-B que frecuentemente se asocian con temperaturas altas (Cabane *et al.*, 2012; Tacarindua *et al.*, 2012.). Aumentó la biosíntesis de lignina pero se redujo el crecimiento de las raíces de *Citrullus lanatus*, lo cual se relacionó con la resistencia a la sequía (Yoshimura *et al.*, 2008).

El máximo contenido de lignina se observó con temperatura cercana a 30 °C, con 34.65 y 26.19 mg LTGA g⁻¹ para la soya transgénica CD213RR y la convencional OC14. El contenido de lignina a 30 °C en CD213RR fue aproximadamente 31 % mayor que el de la OC14; además, en climas más cálidos el contenido de lignina de la soya transgénica es alrededor de 20 % mayor que el de la soya susceptible (Coghlan, 1999). Las consecuencias de una mayor lignificación incluyen mayor rigidez y resistencia del tallo; además, la lignina impermeabiliza la pared celular (Boerjan *et al.*, 2003) y puede generar plantas más resistentes a la sequía, pero también más susceptibles a la rotura del tallo.

Las plantas transgénicas pueden mostrar cambios en la cantidad de lignina, su composición, estructura primaria y efectos fenotípicos al alterar la expresión de un solo gene (Zobiolo *et al.*, 2010). Según Padgett *et al.* (1995) y Facchini *et al.* (2000), la soya transgénica y la convencional tienen diferencias en la composición de varios metabolitos, incluyendo los aminoácidos aromáticos; una de las soyas transgénicas tenía niveles más bajos de fenilalanina que el tipo convencional. Una situación similar se observó en la tirosina del maíz (Sidhu *et al.*, 2000). La fenilalanina y la tirosina son importantes para el desarrollo de la planta como moléculas precursoras para los fenilpropanoides y son la principal vía para la síntesis de compuestos fenólicos, incluyendo los monolignoles, que son precursores de la lignina (Strack, 1997).

Por tanto, es razonable considerar que las diferencias en la composición de metabolitos en las semillas de soya transgénicas podrían estar relacionadas con la expresión de una variante de la EPSPS, mejorando así el contenido de lignina. Esta es una característica importante ya que puede estar asociada con una mayor tolerancia a la sequía y al calor, pero también con alteraciones en el crecimiento y una mayor susceptibilidad a la rotura del tallo.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships and financial support.

LITERATURE CITED

- Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-46.
- Boudet, A. L., S. Kajita, J. Grima-Pettenati, and D. Goffner. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* 8: 576-581.
- Brenbrook, C. M. 2001. Troubled times amid commercial success for roundup ready soybeans: glyphosate efficacy is slipping and unstable transgene expression erodes plant defenses and yields. *Ag Biotech. Tech. Infonet Technol.* 4: 1-69. <http://www.biotech-info.net/troubledtimes.html>. (Access: September 2006).
- Cabane, M., A. Dany, and S. Hawkins. 2012. Lignins and abiotic stresses. *Adv. Bot. Res.* 61: 219-262.
- Challinor, A. J., and T. R. Wheeler. 2008. Crop yield reduction in the tropics under climate change: Processes and uncertainties. *Agr. For. Meteorol.* 148: 343-356.
- Chen, M., A. J. Sommer, and J. W. McClure. 2000. Fourier transform-IR determination of protein contamination in thioglycolic acid lignin from radish seedlings, and improved methods for extractive-free cell wall preparation. *Phytochem. Analysis* 11: 153-159.
- Coghlan, A. 1999. Splitting headache: Monsanto's modified soybeans are cracking up in the heat. *New Scientist* 20. <http://www.biotech-info.net/cracking.pdf>. (Access: September 2006).
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2011. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Safra 2010-2011. Décimo primeiro levantamento. Agosto/2011. www.conab.gov.br. (Access: September 2011).
- Dixon, R. A., and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2010. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2011: Sistemas de Produção 14. Embrapa. Londrina. 247 p. www.cnpso.embrapa.br/download/Sistema_Producao14_VE.pdf. (Access: August 2011).
- Fancchini, P. J., K. L. Huber-Allanach, and L. W. Tari. 2000. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* 54: 121-138.
- Ferrarese, M. L. L., J. D. Rodrigues, and O. Ferrarese-Filho. 2000. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean measured by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biol.* 2: 152-153.
- Ferrarese, M. L. L., A. Zottis, and O. Ferrarese-Filho. 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia* 57: 541-543.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados indica que la soya CD213RR y la OC14 se adaptan a las temperaturas más altas, pero la transgénica reveló crecimiento reducido de la raíz y una mayor lignificación. Estas características podrían estar relacionadas con la expresión de una variante de la EPSPS y es una característica intrínseca de la soya transgénica.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- Ferreira, D. F. 2006. Sisvar - Sistema de Análise de Variância. Universidade Federal de Lavras, DEX/UFLA. Software.
- Harrison, L. A., M. R. Bailey, M. Naylor, J. Ream, and D. L. Hammond. 1996. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute gavage administration. *J. Nutr.* 128: 756-761.
- Miyasaka, S., and J. C. Medina. 1981. A Soja no Brasil. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. 1062 p.
- Nagarajan, S., D. K. Joshi, A. Anand, A. P. S. Verma, and P. C. Pathak. 2005. Proton NMR transverse relaxation time and membrane stability in wheat leaves exposed to high temperature shock. *Indian J. Biochem. Biophys.* 42: 122-126.
- Padgett, S. R., N. B. Taylor, D. L. Nida, M. R. Bailey, J. Macdonald, L. R. Holtan, and R. L. Fuchs. 1995. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to conventional soybeans. *J. Nutr.* 126: 702-716.
- Polle, A., T. Otter, and F. Seifert. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106: 53-60.
- Sánchez, M., M. J. Pena, G. Revilla, and I. Zarra. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic and associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiol.* 111: 941-946.
- Santos, W. D., M. L. L. Ferrarese, A. Finger, A. C. N. Teixeira, and O. Ferrarese-Filho. 2004. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. *J. Chem. Ecol.* 30: 1199-1208.
- Santos, V. L. M., A. C. Calil, H. A. Ruiz, E. M. Alvarenga, and C. M. Santos. 1992. Efeito do estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de soja. *Rev. Bras. Sementes* 14: 189-194.
- Sidhu, R. S., B. G. Hammond, R. L. Fuchs, J. N. Mutz, L. R. Holden, B. George, and T. Olson. 2000. Glyphosate-tolerant corn: The composition and feeding value of grain from glyphosate tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 2305-2312.
- Steinrucken, H. C., and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic

- acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94: 1207-1212.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. *In*: Dey, P. M., and J. B. Harborne (eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego/London. pp: 387-416.
- Tacarindua, C. R. P., T. Shiraiwa, K. Homma, E. Kumagai, and R. Sameshima. 2012. *Field Crops Res.* 131: 26-31.
- Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, and W. Boerjan. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153: 895-905.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Von Pinho, E. V. R. 2002. Identificação de cultivares de soja modificada geneticamente através de marcadores morfológicos e moleculares. *Anais do II Congresso Brasileiro de Soja* 180: 17-23.
- Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A., and K. Akashi. 2008. Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol.* 49: 226-241.
- Zobiolo, L. H. S., E. A. Bonini, R. S. Oliveira-Junior, R. J. K.remer, and O. Ferrarese-Filho. 2010. Glyphosate affects lignin content and amino acid production in glyphosate-resistant soybean. *Acta Physiol. Plant.* 32:831-837.