

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Caracterização bioquímica e fisiológica de plantas de soja GM em condições
de estresse por excesso e déficit hídrico**

Martina Bianca Fuhrmann

Pelotas, 2016

Martina Bianca Fuhrmann

Caracterização bioquímica e fisiológica de plantas de soja GM em condições de estresse por excesso e déficit hídrico

Trabalho de conclusão apresentado à Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Luciano da Silva Pinto
Co-orientador: Liliane Márcia Mertz Henning

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na
Publicação

F961c Fuhrmann, Martina Bianca

Caracterização bioquímica e fisiológica de plantas de soja gm em condições de estresse por excesso e déficit hídrico / Martina Bianca Fuhrmann ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Liliane Márcia Mertz Henning, coorientadora. — Pelotas, 2016.

81 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Glycine max. 2. Estresse abiótico. 3. Enzimas. 4. Transgênicos. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Henning, Liliane Márcia Mertz, coorient. III. Título.

CDD : 633.34

Martina Bianca Fuhrmann

Caracterização bioquímica e fisiológica de plantas de soja GM em condições de estresse por excesso e déficit hídrico

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 07 de dezembro de 2016

Banca examinadora:

.....

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Dra. Ana Cláudia Barneche de Oliveira

Doutora em Agronomia (Fitotecnia) pela Universidade Federal de Lavras

.....

Dra. Juliana Marcolino Gomes

Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Londrina

Life finds a way
(Jurassic Park, 1992)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado forças para continuar em todos os momentos, seja vendo a beleza dos momentos bons ou me levantando em momentos ruins.

Gostaria de agradecer a minha família, minha mãe Marta por ter me dado o apoio psicológico, físico e financeiro, sendo meu exemplo de pessoa que batalha e não desiste perante adversidades, superando as dificuldades de criar e educar duas filhas sozinha. A minha irmã Paola por ser essa pessoa única e peculiar. Ao meu avô Hubert por sempre me esperar com um sorriso no rosto e ser uma das pessoas mais incríveis que já conheci e na qual eu me espelho para minha vida. A minha vó, Zilda, por me cuidar desde quando era criança até os dias de hoje quando voltava com fome da faculdade.

A Universidade Federal de Pelotas por dar o suporte para realizar a graduação em Biotecnologia.

Ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro durante o período de iniciação científica.

A Embrapa por me acolher durante a graduação e por fornecer um ambiente no qual pudesse realizar pesquisa e crescer como indivíduo durante a graduação e igualmente durante o trabalho de conclusão de curso e estágio final.

Aos meus melhores amigos, Carolina, por ser minha melhor amiga em Pelotas, e Gi, por ser minha melhor amiga em Londrina.

Aos velhos e novos amigos dos quais passaram em minha vida e permaneceram, Frederico, Phillip, Kassia, Nosa, Kamila, Thaís, Luciano, Juliane, Rafaela, Natália, Camila e Maiara, cada qual deixando diferentes lembranças e marcas em mim.

A minha orientadora durante a graduação Dra. Ana Cláudia por toda compreensão, disponibilidade e paciência para transmitir todos os seus conhecimentos, além de me prover incríveis oportunidades para expandir meus horizontes e se tornar uma grande amiga. Certamente não poderia ter tido uma orientadora melhor.

A minha orientadora de estágio Dra. Liliane, pela dedicação e empenho para tornar meu TCC uma experiência tão desafiadora quanto enriquecedora para minha

vida, além de ser uma amiga/orientadora principalmente por me incentivar e me dar o apoio e suporte para seguir meus sonhos, sendo um exemplo para a futura pesquisadora que quero me tornar.

A Dra. Larissa, por toda paciência e dedicação ao experimento e ser essa pessoa disposta e entusiasmada, da qual terei ótimas lembranças e histórias da amizade e trabalho no laboratório.

Ao professor Dr. Luciano por aceitar o desafio de ser meu orientador acadêmico, acreditar no meu potencial durante a graduação, ser um excelente professor e agora paraninfo e por despertar minha curiosidade pela bioinformática.

Aos funcionários da Embrapa Clima Temperado, Tomé, Canário, Tim, Jacinto, Vanderlei, pela companhia, brincadeiras e histórias durante os dias de trabalho, vocês foram uma família para mim.

Aos professores do ensino médio e fundamental os quais merecem o reconhecimento, pois sem eles não teria chegado até aqui.

A todos professores da graduação pelos conhecimentos, experiências, sabedoria e informações compartilhadas.

Resumo

FUHRMANN, Martina Bianca. Caracterização bioquímica e fisiológica de plantas de soja GM em condições de estresse por excesso e déficit hídrico. 2016. 81f. Trabalho de Conclusão – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A soja é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são expressivamente usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química, de alimentos e como fonte para biocombustível. Porém, fatores bióticos e abióticos comprometem a produtividade de várias culturas de grãos e afetam negativamente aspectos econômico-financeiros. O principal estresse abiótico é relacionado com a disponibilidade hídrica, pelo fato de que não há métodos de absoluto controle do fator climático, o que incentiva a busca por métodos e novas tecnologias que possam amenizar os efeitos apresentados. Dentre esses métodos a transgênese vem sendo uma importante ferramenta para gerar plantas mais adaptadas a diversos ambientes. Por esse motivo a EMBRAPA Soja vem desenvolvendo genótipos transgênicos com enfoque a tolerância ao déficit hídrico. Contudo estudos vem demonstrando a existência de sinalização cruzada entre genes de excesso e déficit hídrico, o que pode vir a comprovar novos mecanismos e identificar genes para transformação que possam promover tolerância ao déficit hídrico e igualmente ao excesso hídrico, resultando em um genótipo adaptado as diferentes condições climáticas. Com essa proposição o objetivo do trabalho foi avaliar três genótipos geneticamente modificados de soja (1Ea2939, 2Ia4, 2Ha11) em comparação com seus *backgrounds* nas condições de déficit hídrico e encharcamento. Adicionalmente, ferramentas da bioinformática foram utilizadas, a fim de investigar a existência de sinalização cruzada entre os estresses de déficit hídrico e encharcamento. Foram avaliados aspectos fisiológicos na folha como concentração intercelular de gás carbônico, fotossíntese, clorofila, transpiração, condutância estomática e taxa de crescimento absoluto, também foram avaliados parâmetros bioquímicos em amostras de folha e raiz, como conteúdo total de proteínas solúveis, conteúdo de peróxido de hidrogênio e atividade de catalase para verificar a formação de espécies reativas de oxigênio bem como a atividade enzimática para eliminar as mesmas. Os dados de expressão indicaram a existência de um grande número de genes comuns envolvidos nas respostas do estresse por déficit hídrico e encharcamento. O genótipo 1Ea2939 apresentou resultados significativos em comparação com seu *background* para a clorofila e proteína totais solúveis, bem como demonstrou interação genótipo tratamento no déficit hídrico para condutância estomática, fotossíntese e transpiração, apresentando desempenho superior na condição de déficit hídrico. Além disso, no excesso hídrico a linhagem GM 1Ea2939 apresentou maior taxa fotossintética e maior conteúdo de clorofila em comparação a respectiva cultivar convencional. Para as demais linhagens, não se observou desempenho melhor desses materiais quando submetidos as condições de estresses, indicando a necessidade de novos ensaios em que sejam testados diferentes períodos de exposição ao estresse.

Palavras-Chaves: *Glycine max*, estresse abiótico, enzimas, transgênicos

Abstract

FUHRMANN, Martina Bianca. Biochemical and physiological characterization of GM soybeans under conditions of water stress for flooding and drought stress. 2016. 81p. Final Project – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Soybean is one of the most important crops in the global economy. Its grains are expressively used by the agribusiness (production of vegetable oil and animal feed), chemical industry, food and as a feedstock for biofuel. In Brazil and worldwide, biotic and abiotic factors compromise the productivity of various grain crops and have a negative impact on economic aspects. The main abiotic stress is related to the water availability, since there are no methods of absolute control of the climatic impact, which encourages the research for methods and new technologies which can soften the presented effects. Among these methods, transgenesis has been an important tool to generate plants adapted to different environments. For this reason, EMBRAPA Soja (Brazil) has been developing transgenic genotypes with a focus on tolerance to drought stress. However, studies have demonstrated the existence of cross-signaling between genes of excess and water deficit, which may prove new mechanisms and identify genes for transformation that may promote tolerance to water deficit and to water excess, resulting in a genotype adapted to the different weather conditions. With this proposition, the objective of the work was to evaluate three genetically modified genotypes of soybeans (1Ea2939, 2Ia4, 2Ha11) in comparison to their backgrounds in drought and flooding conditions. In addition, bioinformatics tools were used to investigate the existence of cross-signaling between drought and flooding stresses. Physiological aspects were evaluated in leaf as intercellular carbon dioxide concentration, photosynthesis, chlorophyll, transpiration, stomatal conductance and absolute growth rate. Biochemical parameters were also evaluated in leaf and root samples, as total soluble protein content, quantity of hydrogen peroxide and catalase activity to verify the formation of reactive oxygen species as well as the enzymatic activity to eliminate them. Gene expression data indicated the existence of many common genes involved in drought and flooding stress responses. The genotype 1Ea2939 presented significant results in comparison to its background for total chlorophyll and protein soluble, as well as demonstrated interaction genotype treatment in the drought for stomatal conductance, photosynthesis and transpiration, exhibiting superior performance in the dry condition. In addition, in the waterlogging the GM 1Ea2939 line presented higher photosynthetic rate and higher chlorophyll content in comparison to the respective conventional cultivar. For the other genotypes, it was not observed superior performance of these materials when submitted to stress conditions, indicating the need for new tests in which different periods of exposure to stress are tested.

Keywords: *Glycine max*, abiotic stress, enzymes, transgenic

Lista de Figuras

Figura 1. a) Experimento instalado na casa de vegetação. b) Plântulas germinadas dispostas em pares nos vasos.

Figura 2. a) Experimento em casa de vegetação antes da aplicação do estresse. b) Experimento em casa de vegetação após aplicação do estresse. c) Indução de estresse por excesso hídrico.

Figura 3. Delineamento do experimento em blocos ao acaso. Disposição dos vasos na casa de vegetação. Cinco genótipos, três sendo três linhagens GM para a tolerância a déficit hídrico (1Ea2939, 2Ia4 e 2Ha11) e duas cultivares convencionais (BR16 e BRS 184).

Figura 4. a) Material coletado de trifólios. b) Material coletado das raízes.

Figura 5. a) Pesagem das alíquotas para enzimas em 100mg. b) Amostra de raiz após adição de tampão de extração e centrifugação,

Figura 6. a) Preparação do Comassie Blue para o protocolo do método de BRADFORD (1976). b) Frascos para Curva Padrão de BSA de 2mg por mL.

Figura 7. Programa de Estatística R (<http://www.estatisticador.xpg.com.br/>).

Figura 8. Hit Map da BR4 sob estresse hídrico de por excesso hídrico com relação ao controle (NAKAYAMA, 2016), onde pontos vermelhos demonstram genes down regulados e pontos azuis demonstram genes up regulados

Figura 9. Hit Map da BR16 sob estresse hídrico de déficit hídrico com relação ao controle (MARIN, 2014), onde pontos vermelhos demonstram genes down regulados e pontos azuis demonstram genes up regulados.

Figura 10. Diagrama de Venn demonstrando genes observados no GeneSifter exclusivos para cada estresse e genes compartilhados pelos mesmos ao centro.

Figura 11. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição controle após 7 dias de experimento.

Figura 12. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição de escassez hídrica (déficit hídrico) após 7 dias de experimento.

Figura 13. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição de excesso hídrico (hipóxia) após 7 dias de experimento.

Figura 14. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 1Ea2939 e o seu background BR 16. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para comparação entre genótipo; Letra minúscula para comparação entre tratamento. NS – Não significativo. ANOVA e Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade.

Figura 15. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 1Ea2939 e o seu background BR 16 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade.

Figura 16. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2Ia4 e 2Ha11) e seu respectivo background BRS 184 na condição de controle após 7 dias de experimento.

Figura 17. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2Ia4 e 2Ha11) e seu respectivo background BRS 184 na condição de escassez hídrica (déficit hídrico) após 7 dias de experimento.

Figura 18. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2Ia4 e 2Ha11) e seu respectivo background BRS 184 na condição de excesso hídrico (hipóxia) após 7 dias de experimento.

Figura 19. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 2Ia4 e o seu background BR 184. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade.

Figura 20. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 2Ia4 e o seu background BR 184 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade.

Figura 21. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 2Ha11 e o seu background BR 184. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade.

Figura 22. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 2Ha11 e o seu background BR 184 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

Figura 23. a) Amostra de folha com adição de Trizol. b) Amostra de raiz com adição de clorofórmio. c) Amostra de raiz com segunda lavagem por clorofórmio após agitação no vórtex. d) Amostra de folha após centrifugação, sendo a parte retirada o sobrenadante e o pellet descartado.

Figura 24. Gel de integridade do RNA extraído. Gel de Agarose 1% Tampão TAE. Marcador 1Kb Plus. C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

Figura 25. Gel de produto de PCR da β -Actina onde a amostra S GOLS F apresentou DNA após tratamento com DNase e as demais amostras se mostraram negativas. Gel de Agarose 1% Tampão SB. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

Figura 26. Gel de Qualidade do RNA após tratamento com DNase, observou-se degradação das amostras E NCED F e C AREB F enquanto as demais mantiveram sua integridade pós tratamento. Gel de Agarose 1% Tampão TAE. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

Figura 27. Gel de produto de PCR de β -Actina após a síntese de cDNA, onde era esperado o aparecimento de banda na posição de 512 kb, somente a amostra C BR16 R se mostrou negativa. Gel de Agarose 1% Tampão SB. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; CN – Controle Negativo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

Figura 28. Curva padrão da absorbância x concentração de Albumina Bovina Sérica (BSA) de uma solução de 100ug/uL a 595nm.

Figura 29. Curva padrão da absorbância x concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) de uma solução de 25ug/10mL.

Figura 30. Curva padrão da absorbância x concentração de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) de uma solução de 50ug/10mL.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estádios Vegetativos e Reprodutivos da Soja. Adaptado de FEHR; CAVINESS, 1977; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007.

Tabela 2. Identificação dos genótipos utilizados no experimento com suas respectivas construções e backgrounds.

Tabela 3. Volumes utilizados de solução de BSA (2 mg/mL) para obter diferentes concentrações de BSA e confeccionar a curva padrão para quantificação de Proteínas Totais Solúveis na folha e raiz.

Tabela 4. Volumes utilizados de 25 μ L H₂O₂ em 10 mL de água para obter diferentes concentrações de H₂O₂ e confeccionar a curva padrão para quantificação de H₂O₂ na folha.

Tabela 5. Volumes utilizados de 50 μ L H₂O₂ em 10 mL de água para obter diferentes concentrações de H₂O₂ e confeccionar a curva padrão para quantificação de H₂O₂ na raiz.

Tabela 6. Genes *up* e *down* regulados no genótipo BR16 submetido a déficit hídrico e no genótipo BR4 submetido ao excesso hídrico (MARIN, 2014; NAKAYAMA, 2016).

Lista de Abreviaturas e Siglas

A	Taxa Fotossintética
ABA	Ácido Abscísico
ABRE	Elementos de Resposta ao Ácido Abscísico
ADH	Álcool Desidrogenase
AP2/ERF	APETALA 2/Ethylene-responsive Element Binding Fator
AREB	ABA-Responsive Element-Binding Protein
BSA	Albumina Bovina Sérica
bZIP	Basic Leucine Zipper Domains
CAT	Catalase
Ci	Concentração Intercelular de Dióxido de Carbono
CO ₂	Gás Carbônico ou Dióxido de Carbono
CRT	C-Repeat
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Drought-responsive Element
DREB	Dehydration Responsive Element Binding
E	Transpiração
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária
FTs	Fatores de Transcrição
GM	Geneticamente modificada
GOLS	Galactinol Synthase
Gs	Condutância Estomática
MYB	Myeloblastosis oncogene
MYC	Myelocystomatosis
NCED	9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
IRGA	<i>Infra-Red Gas Analyzer</i>
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR	Real Time PCR
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
SPAD	Soil Plant Analysis Development
SSR	Simple Sequence Repeats
TCA	Taxa de Crescimento Absoluto

Lista de Símbolos

®	Registrado
μ	Micro
™	Marca Registrada
B	Beta

Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1. A cultura da soja: Origem e classificação	20
2.1.3. Estádios Fenológicos da Soja	21
2.2. Genoma da Soja	22
2.3. Importância Econômica da Cultura da Soja	23
2.4. Estresses Abióticos e seus Efeitos no Cultivo de Soja no Brasil	25
2.4.1. Impactos do Déficit Hídrico	25
2.4.2. Impactos do Excesso Hídrico	26
2.5. Mecanismos moleculares para tolerância a déficit hídrico e ao excesso hídrico e sinalização cruzada	27
3. Objetivos	30
3.1. Objetivos Gerais	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. Metodologia	31
4.1. Análises in silico	31
4.2. Ensaio em casa-de-vegetação	32
4.3. Coleta de Dados	36
4.3.1. Altura	36
4.3.2. Clorofila	36
4.3.3. Análises Fisiológicas utilizando IRGA LI-6400XT	37
4.4. Coleta de Material	37
4.4.1. Maceração das Amostras	38
4.5. Extração de Enzimas	38
4.5.1. Quantificação de Enzimas Totais	39
4.5.2. Curva Padrão	40
4.5.3. Cálculos	41
4.5.4. Peroxido de Hidrogênio	42
4.5.5. Curva Padrão	42
4.5.6. Cálculos	44
4.5.7. Catalase	44
4.5.8. Cálculos	44

4.6. Estatísticas	45
5. Resultados	46
5.1. Análises in silico.....	46
5.2. Efeitos da Inserção 35S-AtAREB1 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico	49
5.3. Efeitos da Inserção 35S-AtAREB1 nas Respostas Bioquímicas da Soja por Estresse Hídrico	53
5.4. Efeitos da Inserção 35S-AtGols2 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico.....	55
5.5. Efeitos da Inserção 35S-AtGols2 nas Respostas Bioquímicas da Soja por Estresse Hídrico	59
5.6. Efeitos da Inserção 35S-AtNCED3 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico.....	61
5.7. Efeitos da Inserção 35S-AtNCED3 nas Respostas Bioquímicas da Soja por Estresse Hídrico.....	63
6. Discussões	65
7. Perspectivas Futuras	68
7.1. Atividades Realizadas	68
7.1.1. Extração de RNA.....	68
7.1.2. Quantificação das Amostras (Nanodrop).....	70
7.1.3. Gel de Integridade.....	70
7.1.4. Tratamento com DNase	71
7.1.5. PCR com Primer β -Actina	71
7.1.6. Gel de Qualidade do RNA Tratado	72
7.1.7. Síntese de cDNA	72
7.2. Atividades Previstas	73
7.2.1. qRT-PCR.....	73
8. Considerações finais.....	74
Referências Bibliográficas	75
APENDICE A	81
APENDICE B	81

1. Introdução

A soja é um dos principais produtos cultivados no Brasil e no mundo. A expansão da cultura da soja no Brasil se deu principalmente por meio do aumento da área cultivada e incremento na produtividade através dos avanços científicos expressivos que contribuíram na disponibilização de tecnologias ao setor. Todavia no Brasil e no mundo os fatores bióticos e abióticos comprometem a produtividade de várias culturas de grãos e afetam negativamente aspectos econômico-financeiros (MARIN, 2014). O estresse abiótico são a causa de em média 50% das perdas mundiais, enquanto os bióticos reduzem entre 10 a 20% da produtividade (BRAY, 2004), sendo assim a soja pode sofrer tanto pelo excesso de chuvas que prejudica a aeração do solo (hipóxia), favorece o ataque de pragas, diminui a incidência de radiação solar e dificulta o processo de colheita, podendo causa apodrecimento dos grãos, já a escassez hídrica pode comprometer severamente a produtividade, afetando os aspectos fisiológicos da planta (GAVA, 2014).

A capacidade da planta para manter suas atividades metabólicas enquanto desidratada é mediada por respostas celulares que incluem mudanças: no seu ciclo, no sistema de endomembranas e vacuolização; bem como alterações na arquitetura da parede celular (VIEIRA et al., 2013). As plantas alteram o metabolismo de diferentes maneiras, para acomodarem-se ao estresse ambiental (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Recentes avanços na genômica vegetal e o surgimento e expansão de técnicas moleculares têm permitido identificar novos genes, isolar e analisar as funções de genes, cujos produtos codificam para proteínas envolvidas na regulação da homeostase iônica, ajustamento osmótico e desintoxicação celular (MARINHO, 2014; UMEZAWA et al., 2006) elucidando, assim, funções importantes de genes envolvidos na tolerância a estresses ambientais, bem como rotas metabólicas (RIBEIRO, 2011). Nesse contexto a Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária vem desenvolvendo plantas geneticamente modificadas de soja para tolerância ao déficit hídrico por ser esse considerado um dos estresses mais importantes, visto que com o aumento da temperatura

global previsto para o presente séculos, os impactos associados às mudanças climáticas serão sentidos em mundialmente (RIO, 2014). Entretanto estudos recentes demonstram a existência de um mecanismo de sinalização cruzada para o déficit e excesso hídrico (CHEN et al., 2016) ou seja, genes que promovem a defesa e proteção celular contra o estresse por déficit hídrico podem também conferir melhor desempenho as plantas mediante condições de estresse por encharcamento.

Sendo assim, a partir desses fatores, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização fisiológica e bioquímica de plantas geneticamente modificadas com as inserções 35S:AtAREB1, 35S:AtGolS2 e 35S:AtDREB3 em comparação com seus *backgrounds* sob condições de estresse por déficit hídrico e encharcamento, bem com a identificação, através de bancos de RNA-seq, de genes responsivos em ambas condições de estresse.

2. Revisão Bibliográfica

2. 1. A cultura da soja: Origem e classificação

A soja (*Glycine max*) é uma espécie autógama, anual (MAGALHÃES, 2002), herbácea incluída na subdivisão *Angiospermae*, classe *Magnoliopsida* (Dicotiledônea), ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, gênero *Glycine* L (ROCHA, 2009), pertencente a mesma subfamília que o feijão, ervilha e lentilha.

Evidências indicam que a soja foi domesticada e cultivada na China há aproximadamente 5.000 anos atrás, a partir de uma espécie selvagem (*Glycine,soja* Sieb. and Zucc) (BOERMA *et al.*, 2004; BENKO-ISEPPON; NEPOMUCENO; ABDELNOOR, 2012). No Brasil, a cultura foi introduzida pelos Estados Unidos, sendo os primeiros estudos realizados em 1882, por Gustavo Dutra, então professor da Escola de Agronomia da Bahia, por meio da avaliação de cultivares introduzidas (ROCHA, 2009).

As principais variedades comerciais apresentam caule híspido, contendo poucas ramificações, sendo a raiz apresentando um eixo principal e grande número de ramificações. Possuem folhas trifolioladas, com exceção do primeiro par de folhas simples, no nó acima do nó cotiledonar. Têm flores de fecundação autógama, podendo estas serem de cor branca, roxa ou intermediária (PASSOS, 2008). Desenvolvem vagens levemente arqueadas que, à medida que amadurecem, evoluem da cor verde para amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza, e que podem conter de uma a cinco sementes lisas, elípticas ou globosas, de tegumento amarelo pálido, com hilo preto, marrom ou amarelo-palha (RIO, 2014).

Com relação ao hábito de crescimento podem apresentar crescimento indeterminado, quando até o início do florescimento, apenas cerca de metade da estatura final das plantas é atingida, portanto, após esse estágio, a planta ainda apresenta grande crescimento, podendo dobrar sua estatura até a maturação, as folhas presentes no topo são menores que as folhas das demais

partes da planta (SOUZA et al., 2013). O florescimento, assim como a formação de vagens, ocorre de forma escalonada, de baixo para cima na planta. Assim, pode-se ter vagens bem desenvolvidas na base e, ao mesmo tempo, flores no topo da planta. As folhas do topo são menores que as folhas das demais partes da planta.

As cultivares que possuem hábito determinado apresentam..... após o início do florescimento, que ocorre ao mesmo tempo por toda extensão da planta, a mesma cresce pouco e não ramifica. Durante a maturação ocorre o mesmo fenômeno da floração, as vagens maturam ao mesmo tempo. As folhas do topo da planta são praticamente iguais às demais em tamanho.

Existem, ainda, cultivares de soja de tipo de crescimento semi-determinado, isto é, apresentam atributos tanto do tipo determinado como do indeterminado. (MUNDSTOCK, 2005).

A altura da planta depende da interação da região (condições ambientais) e do cultivar (genótipo). A planta de soja é fortemente influenciada pelo comprimento do dia (período de iluminação). Em regiões ou épocas de fotoperíodo mais curto, durante a fase vegetativa da planta, ela tende a induzir o florescimento precoce, e apresentar consecutiva queda de produção (OLIVEIRA, 2010).

2.1.3. Estádios Fenológicos da Soja

O sistema de identificação de estádios fenológicos da soja foi desenvolvido por FEHR; CAVINESS em 1977 (Tabela 1). Este sistema divide a soja em estágio vegetativo e estágio reprodutivo. Sendo os estádios vegetativos representados pela letra V e os estádios reprodutivos pela letra R (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007)

A soja possui grande variabilidade genética, tanto no ciclo vegetativo (período compreendido da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores), como no reprodutivo (período do início da floração até o fim do ciclo da cultura), sendo também influenciada pelo meio ambiente (COPETTI, 2014; THOMAS; COSTA, 2010), esses fatores dificultam que se estabeleça uma quantidade aproximada de dias para a soja alcance determinado estágio, no entanto no Brasil o ciclo completo varia de 100 a 160 dias. Mesmo com certa

dificuldade para estabelecer os estádios os genótipos são caracterizados e classificados por grupos de maturação, são esses, precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, tal classificação por genótipo pode variar de acordo com a região cultivada (TRENTIN et al., 2013).

Tabela 1. Estádios Vegetativos e Reprodutivos da Soja. Adaptado de FEHR; CAVINESS, 1977; FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007.

Estádios vegetativos	Estádios reprodutivos
VE – Emergência	R1 – Início do Florescimento
VC – Cotilédone	R2 – Pleno Florescimento
V1 – Primeiro Nó	R3 – Início da Formação de Vagens
V2 – Segundo Nó	R4 – Plena Formação de Vagens
V3 – Terceiro Nó	R5 – Início do Enchimento de Sementes
...	R6 – Pleno enchimento de Vagens
...	R7 – Início da Maturação
Vn – Enésimo Nó	R8 – Maturação Plena

2.2. Genoma da Soja

O genoma da soja foi publicado em 2010, utilizando como cultivar base a variedade Williams 82. É composto por 40 ($2n=40$) cromossomos, contendo 1.150 milhões de pares de base, as quais representam aproximadamente 85% do genoma total, possuindo 4,991 SNPs e 874 SSR. 57% da sequência genômica ocorre em regiões de heterocromatina rica em repetições e de baixa recombinação e 46,430 predições de *loci* codificadores de proteínas. Foram supostamente identificados 5,671 genes de fatores de transcrição, distribuídos em 63 famílias (SCHMUTZ et al., 2010). O sequenciamento, montagem e anotação do genoma da soja facilita a identificação de traços básicos da genética bem como auxilia na progressão rápida da criação de novas variedades de soja com características desejadas.

Em 2008 se iniciou o projeto GENOSOJA no Brasil, a proposta teve como objetivo estudar o genoma da soja desde a sua organização até ao nível estrutural, procurando caracterizar e sequenciar importantes regiões genômicas e seus produtos, contribuindo assim para a identificação de genes

usando métodos transcricionais e proteômicos, especialmente considerando a resposta da planta a diferentes estresses abióticos que afetam a cultura no hemisfério Sul (BENKO-ISEPPON; NEPOMUCENO; ABDELNOOR, 2012).

2.3. Importância Econômica da Cultura da Soja

No setor do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento mais expressivo (DALL´AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

A soja é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são expressivamente usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso dessa oleaginosa como fonte alternativa de biocombustível (FREITAS, 2011). Atualmente, a maior parte da soja produzida é processada para produção de rações e óleo (ALI, 2010), é estimado que apenas 2% da produção mundial de soja seja consumida na alimentação humana diretamente como alimento (GOLDSMITH, 2008).

A viabilidade econômica da produção de soja é determinada pela utilização comercial de ambos os seus subprodutos, farinha e óleo, que, respectivamente, cerca de dois terços e um terço do valor econômico da safra. Óleo de soja e farinha são consumidos em todo o mundo como alimentos e rações para animais, respectivamente (SILVA *et al.*, 2006). Outro produto importante do chamado complexo soja é o óleo. A demanda por fontes de energia renováveis faz com que os produtos agrícolas ganhem espaço na produção de outros derivados como, por exemplo: os óleos e o etanol para uso combustível (MOREIRA, 2012).

No contexto mundial, o Brasil possui significativa participação na oferta e na demanda de produtos do complexo agroindustrial da soja, o qual vem desempenhando papel fundamental para o desenvolvimento de várias regiões do país (DALL´AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

No Brasil, a soja e o milho permanecem como principais culturas produzidas no país. Os dois produtos correspondem a quase 90% do que é produzido (CONAB, 2016). Grande parte da soja colhida - mais de 30 milhões

de toneladas - vai para indústria de processamento, que a transforma em derivados, como farelo e óleo. O farelo de soja ocupa o segundo lugar nos produtos mais utilizados na elaboração de rações (FREITAS, 2011). O crescimento da cultura da soja no país deve-se principalmente aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo bem como, o forte incremento na área de cultivo (MOREIRA, 2012). A mecanização e o desenvolvimento de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões, o desenvolvimento de estratégias tecnológicas relacionadas ao manejo de solos, ao manejo de adubação e calagem, manejo de pragas e doenças, além da identificação e solução para os principais fatores responsáveis por perdas no processo de colheita, são fatores promotores desse avanço (FREITAS, 2011).

Atualmente, a produção de soja brasileira gera mais de 1,5 milhão de empregos em 17 estados do País (ABIOVE, 2011). Em 2015 o PIB nacional retraiu 3,8% enquanto o PIB do agronegócio cresceu 1,8% em relação ao ano de 2014. O IBGE aponta que o crescimento do setor se deve principalmente ao desempenho da agricultura. Alguns produtos registraram aumento na produção, com destaque para as lavouras de soja, (11,9%) e milho (7,3%). A cana-de-açúcar cresceu 2,4%. Na pecuária, estão o abate de suínos (5,3%) e frango (3,8%) (MAPA, 2016) demonstrando assim que a sojicultura é a principal fonte de investimento e crescimento do mercado atual.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016) a safra 2015/16 a soja alcançou uma área de 33.251,9 hectares, um aumento de 3,4% em relação à safra anterior, obtendo a média de produção de 2.870kg.ha⁻¹, justificada em função das adversidades climáticas e uma produção total de 95.434,6 toneladas. As projeções para safra de 2016/17, segundo a CONAB, são de crescimento de até 6,5 a 8,5% na produção, podendo atingir de 101,6 a 103,5 milhões de toneladas. Também há a expectativa de incremento de área para o cultivo da soja em função da maior liquidez, rentabilidade e menor custo (CONAB, 2016).

2.4. Estresses abióticos e seus Efeitos no Cultivo de Soja no Brasil

Apesar de toda a tecnologia voltada ao desenvolvimento da cultura da soja nos últimos anos, tanto no desenvolvimento de cultivares com alto potencial produtivo, bem como, pela adoção de adequadas práticas de manejo, muitos fatores afetam o desempenho da cultura, causando prejuízos no rendimento.

Culturas produzidas a campo estão expostas a ambientes variáveis que podem promover dificuldades para o crescimento e desenvolvimento da planta, que resulta em perdas significativas (KULCHESKI, 2013).

Não só no Brasil, mas mundialmente, fatores bióticos e abióticos comprometem a produtividade de várias culturas de grãos e afetam negativamente aspectos econômico-financeiros (MARINHO, 2014).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade de produção da cultura da soja, o clima apresenta-se como um dos únicos do qual não é possível ter controle. O fato de não haver métodos de absoluto controle do fator climático incentiva a busca por métodos e novas tecnologias as quais possam amenizar os efeitos apresentados.

Por água representar cerca de 90% do peso da planta da soja, atuando em todos os processos fisiológicos e bioquímicos existentes nesta cultura, a disponibilidade de água no solo é um fator determinante para o seu correto desenvolvimento, principalmente nas fases de germinação-emergência e floração -enchimento de grãos (MONTEIRO, 2009).

2.4.1. Impactos do Déficit Hídrico

O estresse por deficiência hídrica é um dos principais fatores responsáveis pela instabilidade na produção de grãos ao longo dos anos (ARIAS et al., 2007), sendo um dos mais importantes estresses abióticos que limita a produção da soja (FAUSTINO, 2015). A cultura da soja sensível à déficit hídrico, particularmente no que se refere ao estágio de crescimento e reprodução (SILVENTE; SOBOLEV; LARA, 2012). O efeito da deficiência

hídrica na produção depende da época de ocorrência e de sua severidade. Na planta o estresse causado por deficiência de água determina a ocorrência de plantas de soja pouco desenvolvidas, com pequena estatura, área foliar reduzida e entrenós curtos (FERRARI; PAZ; SILVA, 2015). Nas fases de germinação e emergência, diminui o estande de plantas. No florescimento, causa o aborto das flores e impede a antese, enquanto no enchimento dos grãos, afeta o peso dos grãos e sua maturação fisiológica tendo como consequência efeito direto na produção, causando a diminuição severa de produtividade (CASAGRANDE et al., 2001; SILVENTE; SOBOLEV; LARA, 2012). Além disso, a falta de água reduz ou impossibilita o processo fotossintético, isso porque desidrata o citoplasma e fecha os estômatos (TEIXEIRA, 2013).

A cultura da soja submetida ao déficit hídrico apresenta duas fases críticas bem definidas: 1) fase da sementeira à emergência das plântulas e 2) fase de enchimento dos grãos. Na germinação, tanto o excesso como a falta de água são prejudiciais ao estabelecimento da cultura. Neste período, os exageros hídricos são mais limitantes que o déficit hídrico (SALINAS et al., 1989). No entanto, no período de enchimento dos grãos o déficit hídrico é mais prejudicial do que na floração (DOSS, 1974; SIONIT; KRAMER, 1977)

2.4.2. Impactos do Excesso Hídrico

O estresse por alagamento é um dos mais importantes estresses abióticos a nível mundial e é relativamente comum em áreas de cultivo, tendo efeito severo sobre o crescimento e rendimento de plantas cultivadas. Frequente em solos de várzea (solos hidromórficos) (MISSIO et al., 2010), a característica dominante desses solos é a deficiente drenagem natural, devido à topografia predominantemente plana e às suas características físicas como alta densidade, baixa porosidade, alta relação micro/macroporosidade (excessiva predominância de microporos em relação aos macroporos e, em consequência, pouco espaço aéreo), reduzida condutividade hidráulica, baixa velocidade de infiltração e consistência desfavorável (SILVA et al., 2008). O alagamento também pode ocorrer devido ao excesso de chuva, ao rápido

derretimento da neve (ANACHE et al., 2015) e em regiões áridas quando irrigadas em excesso (DENNIS et al., 2000).

A extensão de danos do excesso hídrico do solo sobre os cultivos depende de vários fatores, incluindo a duração do período de inundação, o estágio de desenvolvimento da planta, a espécie e/ou cultivar e as condições ambientais, como temperatura e conteúdo de dióxido de carbono, entre outras (SILVA et al., 2008). Entre as quatro grandes culturas - soja, trigo, milho e arroz - apenas plantas de arroz são adaptadas ao excesso hídrico do solo, e todas são sensíveis à submersão total (BAILEY-SERRES; LEE; BRINTON, 2012).

A deficiência parcial (hipóxia) ou total (anóxia) do gás oxigênio é o principal problema encontrado no estresse por excesso hídrico, pois o oxigênio é componente essencial para produção de energia via respiração aeróbica (BAILEY-SERRES; LEE; BRINTON, 2012). As alterações na concentração de oxigênio podem variar da normóxia (concentração normal), ou seja, situação em que a respiração aeróbica procede normalmente, hipóxia (deficiência de oxigênio), que limita a produção de ATPs oriundos da fosforilação oxidativa, ou anóxia (ausência total de oxigênio), quando não ocorre produção de ATPs via fosforilação oxidativa (SOUSA; SODEK, 2002).

Para a cultura da soja, o excesso hídrico causa prejuízos, o excesso de água expressa menor viabilidade das sementes, prejudica as plantas e favorece a maior intensidade de doenças (THEISEN et al., 2009). Bem como, pode se observar que o excesso hídrico pode causar diminuição no *stand* de plantas (CASAGRANDE et al., 2001). O rendimento de grãos sob condições de solo inundado diminui entre 17 e 43% quando o período de alagamento se deu na fase vegetativa, e 50 a 56% quando o alagamento ocorreu no subperíodo de floração (SCOTT et al., 1989).

2.5. Mecanismos moleculares para tolerância a déficit hídrico e ao excesso hídrico e sinalização cruzada

Tanto a tolerância a déficit hídrico, quanto a tolerância ao excesso hídrico são mecanismos complexos, regulados por um grande número de genes.

Na tolerância à déficit hídrico, trabalhos prévios mostram a existência de duas principais vias que contribuem para a tolerância a déficit hídrico, sendo uma a via ABA (Ácido abscísico) dependente e a outra a via ABA independente.

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal importante que participa de muitos processos fisiológicos nas plantas, entre os quais a ativação de genes responsivos ao estresse. Déficit hídrico, frio, déficit hídrico, calor, entre outros estresses ambientais aumentam os níveis de ABA na planta (LATA; PRASAD, 2011; SINGH; LAXMI, 2015). O ABA além de controlar respostas para adaptação ao estresse, como ativação de genes responsáveis pela regulação osmótica entre outros, também está relacionado com modificações na expressão gênica, aumentando a expressão de vários genes que são responsivos ao estresse. Embora muitos genes sejam induzidos por ABA exógeno, muitos outros não respondem, o que sugere a existência de duas cascatas de transdução, ABA-dependente e ABA-independente (LATA; PRASAD, 2011). A via ABA-dependente tem sido descrita como mediadora de adaptação à déficit hídrico por ativação de proteínas bZIP (Basic leucine Zipper domain) que se ligam aos elementos regulatórios responsivos.

O ABA (ABRE) age em genes alvos, induzindo a transcrição dos mesmos. Além destes, outra via dependente de ABA se refere a biossíntese do MYC (Myelocystomatosis) e fatores de transcrição (FTs) MYB (myeloblastosis oncogene) que conjuntamente regulam a expressão de genes alvos. Já para ABA-independente os membros da família de FTs AP2/ERF (APETALA 2/ethylene-responsive element binding fator) levam a respostas rápidas à déficit hídrico e ao frio, os quais ligam elementos responsivos à déficit hídrico (DRE – Drought-responsive element) em promotores alvo (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012). Os FTs ativados interagem com elementos cis presentes nas regiões promotoras de vários genes relacionados com o estresse, e assim aumentam a expressão de muitos genes relacionados com a tolerância a estresses abióticos (AGRAWAL; FISHBEIN 2006). Proteínas da subfamília DREB (dehydration responsive element-binding protein) interagem com elementos cis DRE/CRT, que geralmente estão presentes nas regiões promotoras de genes envolvidos na resposta ao frio, déficit hídrico e salinidade (ITO et al., 2012)

Inúmeros genes já foram identificados como responsáveis por atuar nos mecanismos de tolerância a déficit hídrico, como por exemplo os genes DREB (dehydration responsive element binding) (LATA; PRASAD, 2011) AREB (ABA-responsive element-binding protein) (LATA; PRASAD, 2011), NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) (ZHANG; YUAN; LENG, 2009) e GOLS (galactinol synthase) (TAJI et al., 2002).

Uma estratégia que vem sendo utilizada pela equipe de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, é o desenvolvimento de plantas Geneticamente Modificadas (GM) superexpressando esses genes (HONNA *et al.*, 2016; MARIN, 2014; MARINHO, 2014; RIBEIRO, 2011).

Resultados de caracterização dessas linhagens GM em casa de vegetação, em plantas sob déficit hídrico, comparadas com o respectivo *background* convencional, mostram que a inserção desses genes promove melhoria no desempenho da soja em condições de déficit hídrico, conferindo uma maior tolerância. No estudo de MARINHO (2014) A soja transformada para expressão do AtAREB1 sob controle do promotor CaMV 35 resultou em maiores taxas de sobrevivência das plantas transformadas após déficit hídrico e re-irrigação bem como fez com que a planta produzisse maior número total de vagens, maior massa déficit hídrico total de vagens, maior número de sementes viáveis, maior massa déficit hídrico de sementes viáveis, maior massa déficit hídrico total de sementes e maior número total de sementes por planta em comparação com seu *background*. Em outro estudo de HONNA (2015) as plantas do evento 35S:AtGols2 apresentaram maior taxa de sobrevivência após 21 dias de déficit hídrico, enquanto o *background* apresentou 100% de mortalidade, além disso o evento exibiu resultados moleculares, de trocas gasosas, umidade gravimétrica do solo e de taxa de sobrevivência mais promissoras frente ao déficit hídrico induzido em condições de casa de vegetação.

Tendo em vista que muitos dos mecanismos de envolvidos na defesa de plantas contra estresses possuem sinalização cruzada para diferentes tipos de estresse, genes que promovem a defesa e proteção celular contra o estresse por déficit hídrico podem também conferir melhor desempenho as plantas mediante condições de estresse por encharcamento.

Atualmente estudos vem sendo desenvolvidos utilizando RNA-seq para compreender melhor a interação de genes nos estresses hídricos bem como possíveis sinalizações cruzadas, que compreende em genes que são expressos igualmente em ambos os estresses. No estudo de CHEN *et al.*, (2016) algumas famílias de fatores de transcrição relacionados com ABA foram identificadas como: AP2 (Activating protein 2), bZIP (Basic Leucine Zipper Domain), MYB e NAC. Na pesquisa de (SYED *et al.*, 2015) a expressão dos genes SUB1 (Submergence 1), PRR7 (Pseudo-Response Regulators 7), TOC1 (Timing Of Cab Expression 1) também foi equivalente em ambos os estresses.

3. Objetivos

3. 1. Objetivos Gerais

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização fisiológica e bioquímica de plantas de soja geneticamente modificadas sob condições de estresse por déficit hídrico e encharcamento.

3. 2. Objetivos Específicos

- 1) Por meio de ferramentas *in silico* e dados de bibliotecas de RNA-seq, verificar mecanismos moleculares envolvidos nas respostas da soja sob condições de déficit hídrico e encharcamento.
- 2) Conduzir em casa de vegetação, ensaio com linhagens de soja GM para tolerância a déficit hídrico, e os respectivos *backgrounds* não transformados, sob condições de estresse por déficit hídrico e encharcamento.
- 3) Realizar medidas fisiológicas, tais como:
 - a) Fotossíntese
 - b) Condutância estomática
 - c) Transpiração

- d) Concentração interna de CO₂
 - e) Clorofila
 - f) Altura da planta
- 4) Avaliar o sistema de defesa antioxidante, por meio da atividade da enzima catalase, bem como avaliar a expressão de espécies reativas de oxigênio através da quantidade de peróxido de hidrogênio e o total de proteínas solúveis no tecido de raiz e folha.

4. Metodologia

4.1. Análises *in silico*

Para a identificação de genes comumente expressos entre os estresses de déficit hídrico e excesso hídrico foram utilizadas bibliotecas de RNA-seq, geradas a partir de tecidos de raízes de soja sob déficit hídrico conduzida conforme descrito por MARIN (2014) e de biblioteca gerada a partir de tecidos de raízes de soja sob hipóxia (simulando encharcamento), geradas conforme NAKAYAMA (2016). Ambas as bibliotecas estão disponibilizadas na plataforma do GeneSifter (<https://login.genesifter.net/>), através dos dados obtidos cruzou-se os dados com seus respectivos controles para verificar quais genes eram diferencialmente expressos no estresse aplicado bem como sua regulação (*up* ou *down* regulado).

Em seguida com os dados gerados a partir do GeneSifter utilizou-se o programa MapMen (<http://mapman.gabipd.org/web/guest>) para classificar os genes em suas respectivas famílias, bem como representar se os mesmos eram *up* ou *down* regulados.

Utilizando o site Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), montou-se um Diagrama de Venn, onde se dispôs os genes para representar a quantidade de genes que os estresses apresentavam em comum bem como quais eram exclusivos de determinado estresse.

4.2. Ensaio em casa-de-vegetação

O experimento foi estabelecido com cinco genótipos, três linhagens GM para a tolerância a déficit hídrico (1Ea2939, 2Ia4 e 2Ha11) e duas cultivares convencionais (BR16 e BRS 184), as quais constituem os *backgrounds* genéticos (cultivares convencionais) utilizados na transformação. As informações acerca dos genótipos utilizados no estudo estão descritas na tabela 2. Todas as linhagens transgênicas foram desenvolvidas pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa, pelo método de *Agrobacterium tumefaciens* (PAZ *et al.*, 2006), as quais foram previamente caracterizadas quanto a homozigose e o número de cópias do transgene.

Tabela 2. Identificação dos genótipos utilizados no experimento com suas respectivas construções e backgrounds.

Identificação do material	Construção	Background	Referência
1Ea2939 (AREB)	35S-AtAREB1	BR16	(MARINHO, 2014)
2Ia4 (GOLS)	35S:AtGoIS2	BRS 184	(HONNA <i>et al.</i> , 2016)
2Ha11 (NCED)	35S:AtNCED3	BRS 184	(MOLINARI <i>et al.</i> , 2016)

Na casa de vegetação o experimento organizado em blocos casualizados contendo seis repetições, conforme representado na Figura 3.

As sementes foram previamente germinadas no dia 18 de julho de 2016 em rolos de papel Germitest® umedecido com volume de água equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco e germinadas por 96 horas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 100% de umidade relativa, conforme a Regra de Análise de Sementes (RAS). No dia 22 de julho de 2016, realizou-se a transferência de duas plântulas para vasos (15 cm diâmetro externo x 10 cm base x 11 cm altura), preenchidos com 1,1 kg de substrato, sendo o substrato composto por areia e solo na proporção 1:1 (Figura 1).



Figura 1. a) Experimento instalado na casa de vegetação. b) Plântulas germinadas dispostas em pares nos vasos.

Após a completa emergência e estabelecimento das plantas, realizou-se o desbaste, mantendo uma planta por vaso. As plantas foram mantidas em condição ideal de irrigação até o estágio V3 (FEHR; CAVINESS, 1977). Nesse estágio, as plantas foram irrigadas até a saturação do solo, e a partir desse período, foi iniciado o estresse. No tratamento de déficit hídrico, o estresse foi aplicado por meio da suspensão da irrigação, no tratamento de encharcamento, as plantas foram alagadas até formar uma altura de 3-5 cm acima da superfície do solo, e no tratamento controle as plantas permaneceram em condição ideal de irrigação (Figura 2).

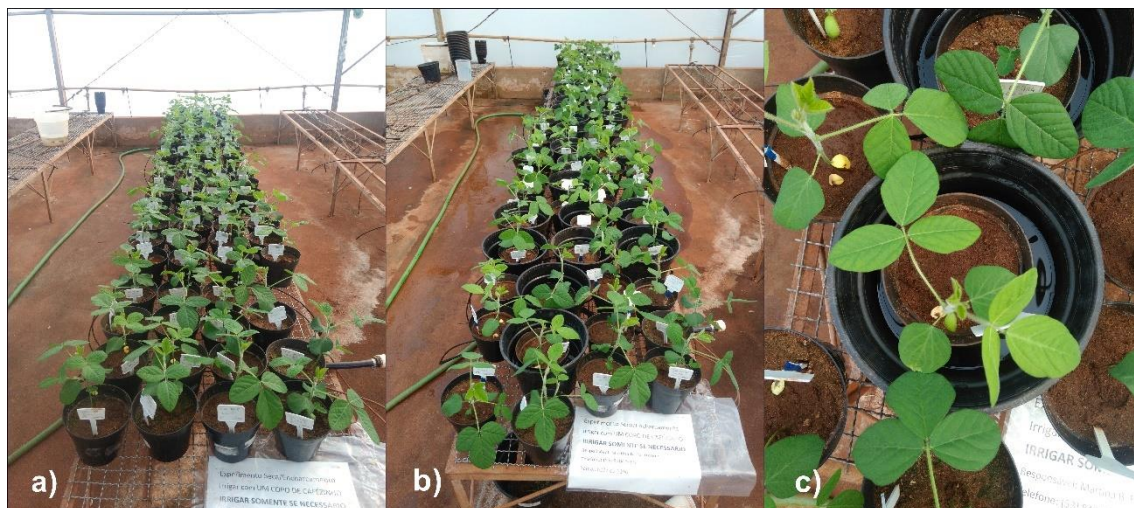


Figura 2. Experimento em casa de vegetação sob diferentes condições de estresse. a) Antes da aplicação do estresse. b) Após aplicação do estresse. c) Indução de estresse por excesso hídrico.

Para determinação da data para coleta utilizou-se as medições de trocas gasosas, tendo como base o parâmetro de condutância estomática, onde as plantas estressadas apresentam um valor inferior de $0,2 \text{ mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

BLOCO 1			
2Ia4	2Ia4	BRS184	BR16
2Ha11	2Ha11	1Ea2939	1Ea2939
2Ha11	BRS184	BR16	BRS184
BR16	2Ia4	1Ea2939	
BLOCO 2			
BRS184	BRS184	2Ia4	2Ha11
2Ha11	1Ea2939	2Ha11	1Ea2939
2Ia4	BR16	BR16	2Ia4
BRS184	1Ea2939	BR16	
BLOCO 3			
2Ha11	2Ha11	2Ia4	2Ia4
1Ea2939	1Ea2939	BRS184	BRS184
BR16	BR16	BR16	2Ia4
2Ha11	1Ea2939	BRS184	
BLOCO 4			
BRS184	1Ea2939	2Ia4	1Ea2939
BRS184	BR16	2Ha11	2Ha11
BR16	1Ea2939	BRS184	2Ha11
BR16	2Ia4	2Ia4	
BLOCO 5			
2Ia4	BRS184	BRS184	SBR16
1Ea2939	BR16	BR16	2Ia4
2Ia4	2Ha11	2Ha11	1Ea2939
2Ha11	1Ea2939	BRS184	
BLOCO 6			
BRS184	BR16	2Ha11	2Ia4
2Ha11	BRS184	2Ia4	1Ea2939
1Ea2939	BRS184	1Ea2939	BR16
2Ia4	2Ha11	BR16	

LEGENDA

	CONTROLE
	SECA
	ENCHARCAMENTO

Figura 3. Delineamento do experimento em blocos ao acaso. Disposição dos vasos na casa de vegetação. Cinco genótipos, três sendo três linhagens GM para a tolerância a déficit hídrico (1Ea2939, 2Ia4 e 2Ha11) e duas cultivares convencionais (BR16 e BRS 184).

4.3. Coleta de Dados

4.3.1. Altura

As medições de altura foram realizadas com o auxílio de uma régua de 30 centímetros, a primeira medição foi realizada no dia 12 de agosto de 2016 e a segunda medição foi feita no dia 18 de agosto de 2016. A partir desses dados, calculou-se a TCA, por meio da fórmula (1):

$$TCA = W2 - W1/\Delta T \quad (1)$$

Onde:

W2 = Mensuração 2 na fase 2

W1= Mensuração 1 na fase 1

ΔT = Diferença de tempo decorrido entre as fases 1 e 2.

4.3.2. Clorofila

As medidas do teor de clorofila foram realizadas no dia 18 de agosto de 2016, no período da manhã, utilizando o aparelho SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*). O SPAD fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha, em duas regiões de comprimento de onda (650 nm e 940 nm), e a absorção de luz pela clorofila ocorre no primeiro comprimento de onda. As leituras foram realizadas em cada planta do bloco, sendo medido o valor SPAD na folha central do terceiro trifólio a partir dos cotilédones. O teor de clorofila foi estimado pela equação (2), conforme metodologia de RODRIGUES *et al.*(2012):

$$\text{Teor de Clorofila} = (\text{SPAD} \times 0,0007) - 0,0071 \quad (2)$$

4.3.3. Análises Fisiológicas utilizando IRGA LI-6400XT

Utilizando o aparelho IRGA LI-6400XT (*Infrared Gas Analyser*) realizou-se a coleta de dados da condutância estomática, transpiração, fotossíntese e teor interno de CO₂ no dia 19 de agosto de 2016.

4.4. Coleta de Material

Um monitoramento diário da condutância estomática foi realizado até as plantas apresentarem valores de gs (condutância estomática) inferiores a 200 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (sete dias de déficit hídrico e de encharcamento). Em seguida, realizou-se a coleta do material, para quantificação da atividade enzimática e posterior extração do RNA e avaliação da expressão gênica. Anteriormente à coleta foi realizada as medidas da taxa fotossintética (A), concentração intercelular de CO₂ (Ci), condutância estomática (Gs), transpiração (E), que foram realizadas no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido sentido ápice-base por meio analisador portátil (LI-6400XT, LI-COR) com uma fonte de luz 90% vermelha + 10% azul e câmara de 2 cm². As medições foram realizadas no interior da casa de vegetação entre 9 e 11h e em boas condições de luminosidade, considerando-se as seguintes condições: radiação fotossinteticamente ativa (PAR), 1000 μmol m⁻² s⁻¹; referência de CO₂, 400 μmol mol⁻¹; referência de água, 18-20 mmol mol⁻¹; fluxo de CO₂, 400 μmol s⁻¹. Determinou-se que as plantas já se apresentavam em estresse no dia 18 de agosto de 2016, sendo assim, foram coletadas amostras de folha e raiz (Figura 4) para análises no dia 19 de agosto de 2016. Coletou-se dois trifólios por planta, bem como parte da raiz. O material foi estocado em folhas de alumínio no nitrogênio líquido e posteriormente armazenado no ultrafreezer a -80°C.



Figura 4. Material coletado das plantas para a obtenção dos trifólios (a). e das raízes (b).

4.4.1. Maceração das Amostras

As amostras foram maceradas utilizando nitrogênio líquido. O nitrogênio foi colocado dentro de um almofariz e macerou-se através do uso de pistilos esterilizados com RNase away, para evitar contaminações que implicariam em posteriores problemas.

4.5. Extração de Enzimas

As enzimas foram extraídas utilizando o material macerado anteriormente, cada material foi separado em dois tubos e foi alíquotado 100 mg (Figura 5a) em cada um deles utilizando uma balança de precisão, após a pesagem acrescentou-se 1mL de tampão de extração (100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 2 mmol L⁻¹ EDTA e 100% (p/p) de PVPP), o material foi centrifugado durante 20 minutos a 4°C a 20000g para que fosse

possível separar a fase líquida dos debris celulares (Figura 5b). Posteriormente a fase líquida foi dividida em 3 tubos para serem utilizados em diferentes protocolos de quantificação enzimática. As amostras foram divididas da seguinte forma: tubo A para Superóxido Desmutase contendo 0,3 mL, o tubo B para a Catalase contendo 0,45mL e o tubo C para a quantificação de proteínas totais solúveis contendo 0,6mL.

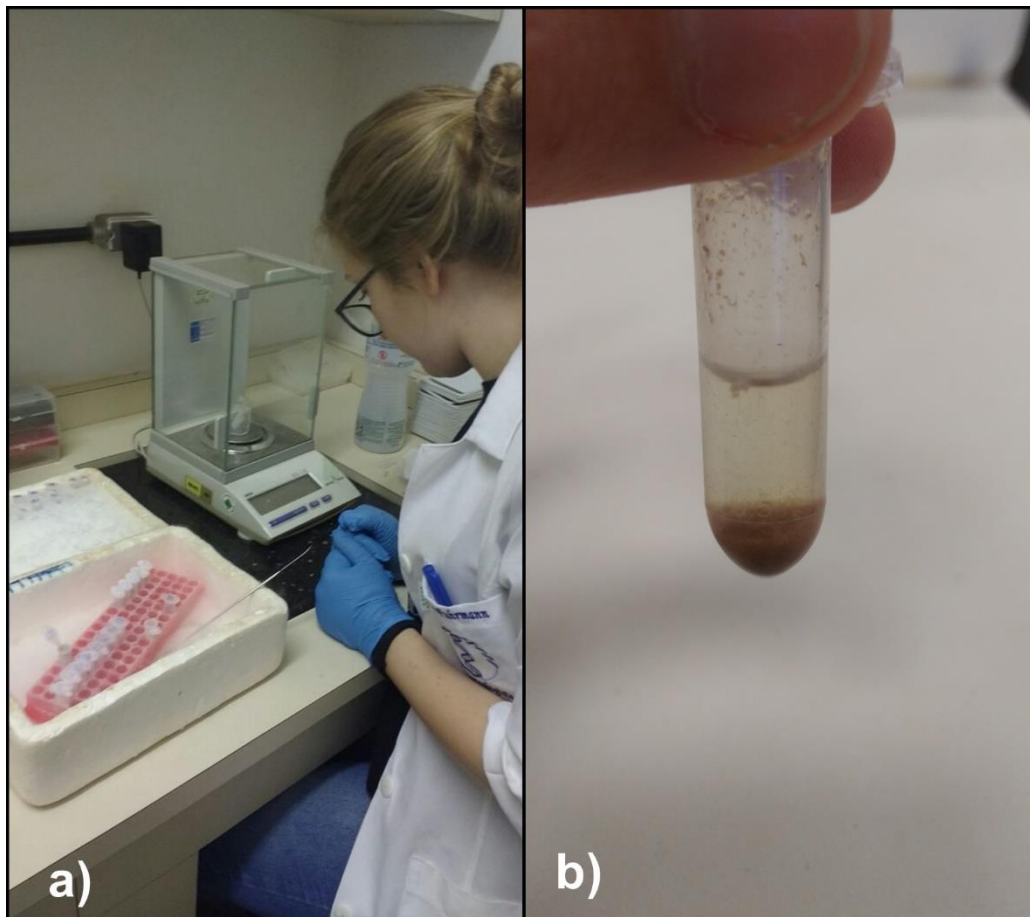


Figura 5. a) Pesagem das alíquotas para enzimas em 100 mg. b) Amostra de raiz após adição de tampão de extração e centrifugação,

4.5.1. Quantificação de Proteínas Totais Solúveis

A quantificação de proteínas totais solúveis foi realizada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976) em triplicata utilizando 0,1 mL de amostra de raiz e 0,05mL de amostra de folha. Para a quantificação foram adicionados 5 mL de reativo de Bradford (Figura 6a) e as amostras foram deixadas em repouso

durante 15 minutos, posteriormente foram realizadas as leituras no espectrofotômetro a 595nm.

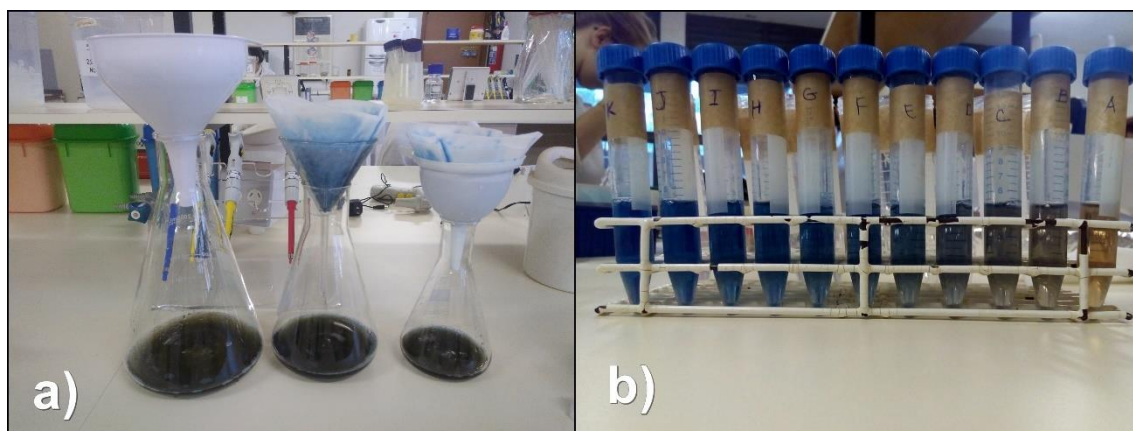


Figura 6. a) Preparação do Coomassie Blue para o protocolo do método de BRADFORD (1976). b) Frascos para Curva Padrão de BSA de 2mg por mL.

4.5.2. Curva Padrão

A curva padrão foi confeccionada utilizando BSA (albumina bovina sérica), pesou-se 200 mg de BSA e dilui-se em 100 mL de água destilada, em seguida diferentes concentrações da solução de BSA foram adicionadas a água destilada (Figura 6b) para que se obtivesse diferentes pontos de concentração de proteína na curva, conforme a Tabela 3.

A curva padrão é realizada para ter valores de absorvância base com relação a concentração de proteína, esses dados podem ser cruzados com a absorvância das amostragens dando um valor mais aproximado da concentração de proteína na amostra que se analisou. Os resultados para curva padrão se encontram no APENDICE A.

Tabela 3. Volumes utilizados de solução de BSA (2mg/mL) para obter diferentes concentrações de BSA e confeccionar a curva padrão para quantificação de Proteínas Totais Solúveis na folha e raiz.

Tubos	Solução de BSA (mL)	H ₂ O destilada (mL)	µg de proteína (em 200µL)
A	-	10	0
B	1	9	20
C	2	8	40
D	3	7	60
E	4	6	80
F	5	5	100
G	6	4	120
H	7	3	140
I	8	2	160
J	9	1	180
K	10	0	200

Em seguida de cada frasco diluído foi transferido 0,1mL para um tubo contendo 5 mL de reativo de Bradford (Figura 6b), os frascos foram mantidos em repouso durante 15 minutos e após esse tempo realizou-se as leituras a 595nm.

Para o branco utilizou-se 5 mL do reativo de Bradford acrescido de 0,1mL de água destilada.

4.5.3. Cálculos

Utilizou-se a equação fornecida pelo gráfico:

$$(X=((Y-0,0533)/0,0042) \quad (3)$$

Onde: X é o valor de proteínas totais e Y é o valor da absorbância.

Após encontrar o valor dividiu-se o mesmo pela massa foliar/radicular contida na reação para obter o valor de µg de proteínas totais solúveis por g de massa fresca.

4.5.4. Peroxido de Hidrogênio

Para a quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizou-se uma reação com base de iodeto de potássio (KI), segundo protocolo estabelecido por Alexieva *et al.*, 2001. O procedimento foi realizado em duplicata.

Inicialmente as amostras previamente maceradas foram pesadas em alíquotas de 100mg, após foram acrescentados 1mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. Em seguida 200 μ L do sobrenadante foi separado em outro tubo e acrescido de 200 μ L de tampão fosfato de potássio a 100 mM e pH 7,5 e 800 μ L de solução de iodeto de potássio (KI) a 1M. Os tubos após breve homogeneização por inversão foram colocados no gelo e mantidos no escuro por um período de 1 hora. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

O branco consistia na mesma solução, porém em substituição dos 200 μ L de amostragem foi adicionado 200 μ L de TCA.

4.5.5. Curva Padrão

Para a curva padrão foram feitos dois gráficos, visto que as amostras de folha apresentavam maior conteúdo de peróxido de hidrogênio em comparação com as raízes.

Foi preparado uma solução padrão para cada curva, uma contendo 25 μ L/10 mL e a outra contendo 50 μ L/10 mL. A solução padrão foi utilizada em diferentes volumes para expressar a concentração por microlitro e completada para 1 mL de água, em seguida passou-se o mesmo volume utilizado de amostragem, 200 μ L, de cada tubo da curva padrão para um tubo contendo 200 μ L de tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5 e 800 μ L de solução de iodeto de potássio a 1M.

O primeiro gráfico para as raízes foi feito com uma solução de 1mg de H_2O_2 /mL, ou seja, 25 μ L H_2O_2 em 10 mL de água (Tabela 4).

Tabela 4. Volumes utilizados de 25 μL H_2O_2 em 10 mL de água para obter diferentes concentrações de H_2O_2 e confeccionar a curva padrão para quantificação de H_2O_2 na folha.

Tubos	Concentração Padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume de H_2O_2 (μL)	Volume de Água (μL)
A	0	0	1000
B	2,5	2,5	997,5
C	5	5	995
D	7,5	7,5	992,5
E	10	10	990
F	12,5	12,5	987,5
G	15	15	985

O segundo gráfico para as folhas foi feito com uma solução de 2mg de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mL}$, ou seja, 50 μL H_2O_2 em 10 mL de água (Tabela 5).

Tabela 5. Volumes utilizados de 50 μL H_2O_2 em 10 mL de água para obter diferentes concentrações de H_2O_2 e confeccionar a curva padrão para quantificação de H_2O_2 na raiz.

Tubos	Concentração Padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume de H_2O_2 (μL)	Volume de Água (μL)
A	0	0	1000
B	5	2,5	997,5
C	10	5	995
D	15	7,5	992,5
E	20	10	990
F	25	12,5	987,5
G	30	15	985

A curva padrão é realizada para ter valores de absorvância base com relação a concentração de peróxido de hidrogênio da solução padrão, esses dados podem ser cruzados com a absorvância das amostragens dando um valor mais aproximado da concentração de peróxido de hidrogênio na amostra que se analisou. Os resultados para curva padrão de peróxido de hidrogênio se encontram no APENDICE B.

4.5.6. Cálculos

Utilizou-se a equação fornecida pelo gráfico 50µL/10mL para os cálculos da folha:

$$X=((Y- 0,0419)/0,3046) \quad (4)$$

Utilizou-se a equação fornecida pelo gráfico 20µL/10mL para os cálculos da raiz:

$$X=((Y- 0,0024)/0,1442) \quad (5)$$

Onde: X é o valor de proteínas totais e Y é o valor da absorbância.

Após encontrar o valor dividiu-se o mesmo pela massa foliar/radicular contida na reação para obter o valor de µg de peróxido de hidrogênio por g de massa fresca.

4.5.7. Catalase

Para a quantificação de catalase utilizou-se o protocolo estabelecido por KAR; MISHRA (1976). Todo o processo deve ser realizado com o mínimo de iluminação, visto que a luz acarreta na degradação da enzima. O procedimento foi realizado em triplicata. Sendo assim, inicialmente preparou-se uma solução inicial onde foi diluído 1,12 mL de H₂O₂ 30% em 200mL de tampão de fosfato de potássio a 100 mM pH 7,5, desta solução foi retirada a quantidade de 131,58 mL e completou-se a solução para 500 mL com o mesmo tampão utilizado anteriormente. Da solução preparada foi pipetou 2,850 mL por tubo, em seguida e acrescentou-se 150 µL de amostra previamente extraída utilizando tampão de extração, agitou-se e já se prosseguiu para leitura no espectrofotômetro a 240nm. Anotou-se o valor de leitura logo após colocar a cubeta no espectrofotômetro e cronometrou-se 60 segundos para anotar a medida final para estimar a atividade da enzima catalase.

4.5.8. Cálculos

Para os cálculos de catalase foi utilizado o protocolo de ANDERSON; PRASAD; STEWART, (1995).

Inicialmente dividiu-se o valor de absorvância pelo coeficiente molar de extinção $36M^{-1}cm^{-1}$, transformou-se o valor de Molar (M) para miliMolar (mM) multiplicando por 1000 e em seguida multiplicou-se pelo volume da reação, nesse caso 2mL, por fim calculou-se o os μg de peróxido de hidrogênio por grama de massa fresca, utilizando os valor de proteínas totais solúveis multiplicado pelo valor de extrato utilizado (150 μL) e dividido pelo valor de tampão de extração utilizado na reação de BRADFORD (1976).

4.6. Estatísticas

Realizou-se a análise de variância e a separação de médias por meio do teste de Tukey HSD, com 5% de probabilidade. A estatística para os gráficos foi feita utilizando o programa R (Figura 7).

As amostras foram separadas utilizando letras maiúsculas para a separação de diferença entre genótipos e letra minúscula para separação de diferença entre os tratamentos.

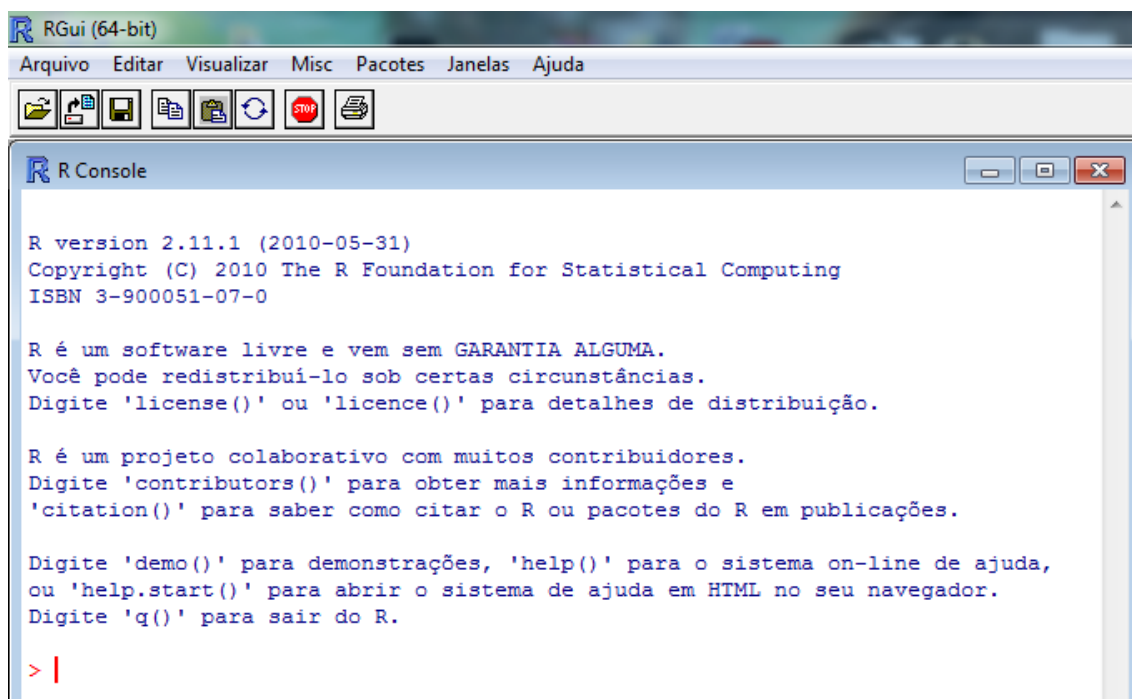


Figura 7. Programa de Estatística R (<http://www.estatisticador.xpg.com.br/>).

5. Resultados

5.1. Análises *in silico*

Por meio da análise *in silico*, através do programa Gene Sifter, foi possível obter a relação dos genes diferencialmente expressos em duas bibliotecas de soja, sendo uma constituída de tecidos de raízes sob déficit hídrico, e outra sob excesso hídrico (Tabela 6). Foram considerados os genes *up* e *down* regulados, usando o *fold change* > 2 e <2, na comparação com a situação controle.

Os dados foram normalizados através no número total de *reads* mapeados a estatística foi feita pelo teste de razão de verossimilhança com Fold-change > 2 <2, correção por Benjamini and Hochberg e transformação de dados por Log2.

Conforme os resultados da tabela 6, um grande número de genes foi alterado em resposta a ambos os estresses, sendo que a maioria desses foi *down* regulado (Tabela 6). Os resultados mostraram ainda, um número maior de genes diferencialmente expressos na condição de hipóxia, apresentando 18823 genes diferencialmente expressos conforme pode ser observado na Tabela 6, com a maioria dos genes *down* regulados (12281 genes), aproximadamente o dobro dos genes que foram *up* regulados (6542 genes).

Para o déficit hídrico foram identificados 5422 genes diferencialmente expressos, sendo que mais genes se apresentaram *down* regulados (3456 genes) do que *up* regulados (1957), conforme observado na Tabela 6.

Tabela 6. Genes *up* e *down* regulados no genótipo BR16 submetido a déficit hídrico e no genótipo BR4 submetido ao hipóxia (simulando estresse por encharcamento) (MARIN, 2014; NAKAYAMA, 2016).

Genótipo	Tratamento	Genes <i>up</i> regulados	Genes <i>down</i> regulados	Total de Genes
BR16	Déficit hídrico	1957	3465	5422
BR4	Encharcamento	6542	12281	18823

A partir dos resultados dos genes diferencialmente expressos, foi utilizado o software MapMen, para verificar as alterações no padrão de expressão de genes relacionados as principais famílias, como a Citocromo P450, UDP Glucosiltransferase, Peroxidase, Glucosidases.

No Hit Map as mesmas famílias que apresentaram mais genes no excesso hídrico (Figura 8) como a superfamília do Citocromo P450, UDP Glucosiltransferase, Peroxidase, Glucosidases também apresentaram maior número de genes no déficit hídrico (Figura 9).

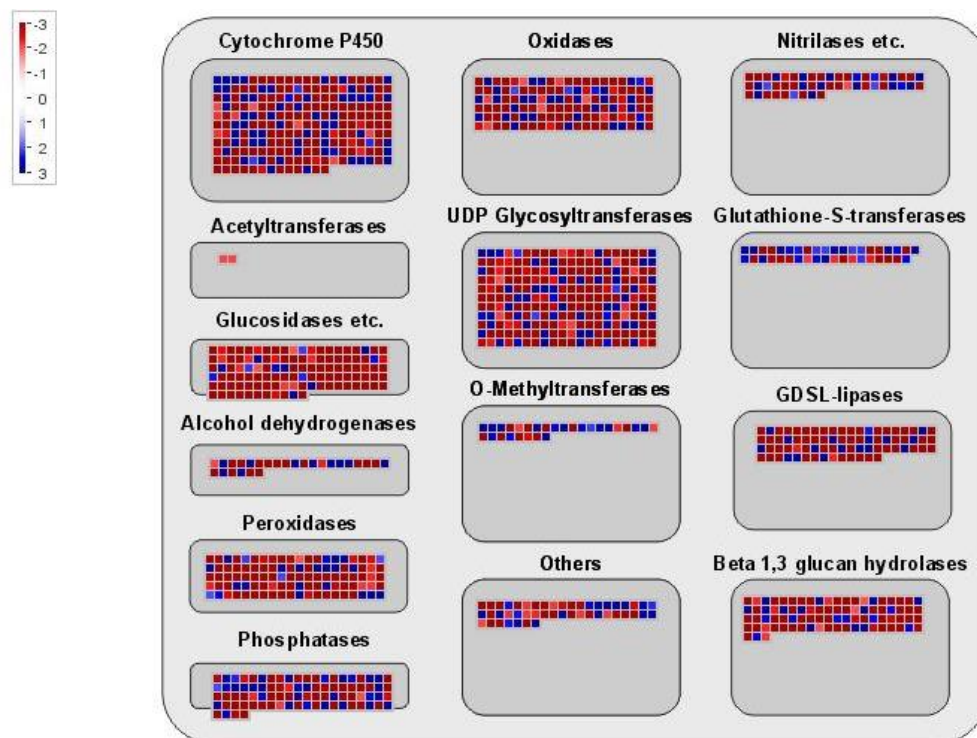


Figura 8. Hit Map da BR4 sob estresse hídrico de excesso hídrico com relação ao controle (NAKAYAMA, 2016), onde pontos vermelhos demonstram genes *down* regulados e pontos azuis demonstram genes *up* regulados

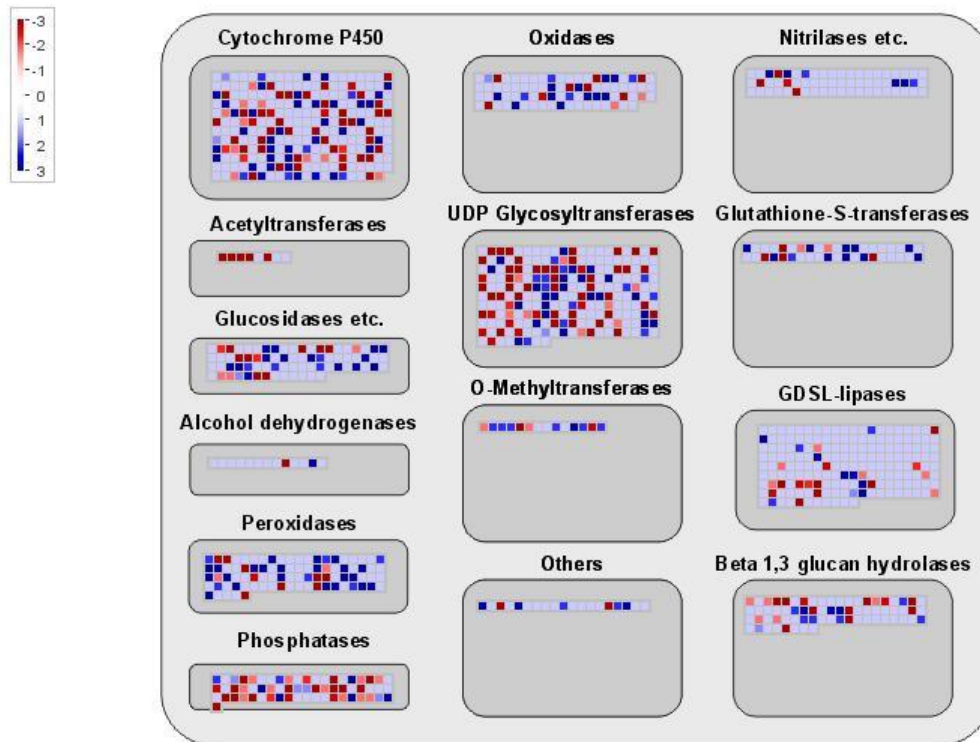


Figura 9. Hit Map da BR16 sob estresse hídrico de déficit hídrico com relação ao controle (MARIN, 2014), onde pontos vermelhos demonstram genes *down* regulados e pontos azuis demonstram genes *up* regulados.

O diagrama de Venn gerado a partir do número de glymas do estresse por déficit hídrico e excesso hídrico (Figura 10) demonstrou que 2931 genes são exclusivamente expressos no déficit hídrico e 16332 são exclusivos do encharcamento, no entanto 2491 genes foram diferencialmente regulados em ambos estresses.

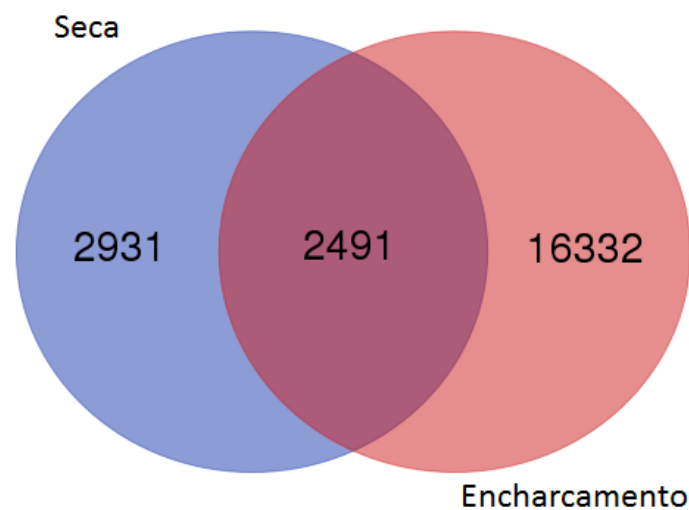


Figura 10. Diagrama de Venn demonstrando genes observados no GeneSifter exclusivos para cada estresse e genes compartilhados pelos mesmos ao centro.

5.2. Efeitos da Inserção 35S-AtAREB1 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico

Na comparação de respostas fisiológicas entre a inserção 35S-AtAREB1 (1Ea2939) e seu background BR 16, inicialmente realizou-se o registro fotográfico das plantas sob os diferentes tratamentos para analisar a aparência das plantas (Figura 11;12;13), e posteriormente, realizou-se as leituras das variáveis fisiológicas (Figura 14). Pelos dados de análise de variância, observou-se efeito do genótipo para clorofila, efeito do tratamento para a taxa de crescimento absoluto e interação entre genótipo e tratamento para condutância estomática, fotossíntese e transpiração. Para concentração interna de CO₂ não se observou efeito de genótipo e nem de tratamento (Figura14a).

O genótipo 1Ea2939 apresentou mais conteúdo de clorofila em todos os tratamentos em comparação com a BR 16 (Figura14d). Já para a taxa de crescimento absoluto, houve efeito apenas do tratamento, sendo que o déficit hídrico resultou em plantas de menor estatura, em relação a déficit hídrico e excesso hídrico (Figura14f).

Houve interação entre genótipo e tratamento para a fotossíntese, onde o genótipo 1Ea2939 apresentou maior taxa fotossintética em comparação a cultivar BR16, tanto na condição de déficit hídrico, como no excesso hídrico (Figura14b).

A condutância estomática e a transpiração foram afetadas pelo déficit hídrico, sendo que novamente o genótipo 1Ea2939 foi mais eficiente em manter padrões mínimos dessas variáveis, contribuindo para manutenção da fisiologia da planta sob estresse (Figura 14c;14e).

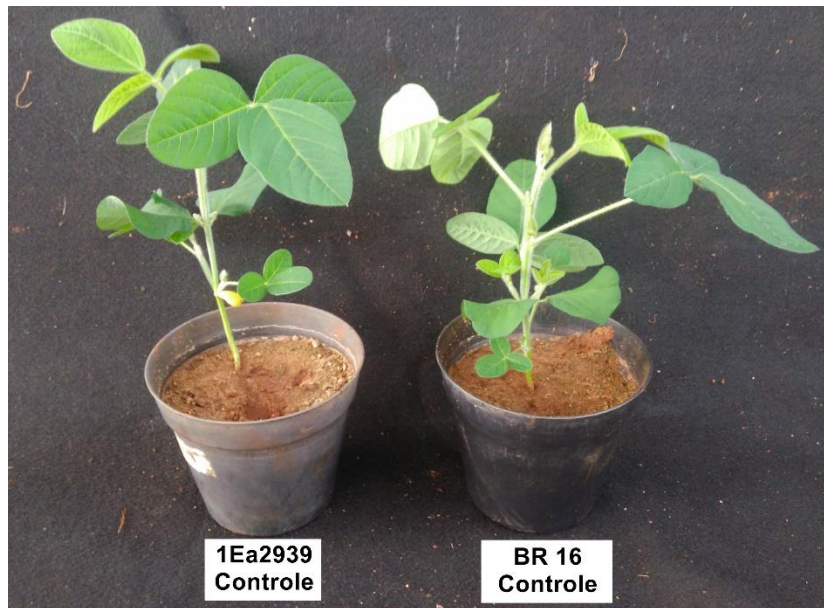


Figura 11. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição controle após 7 dias de experimento.

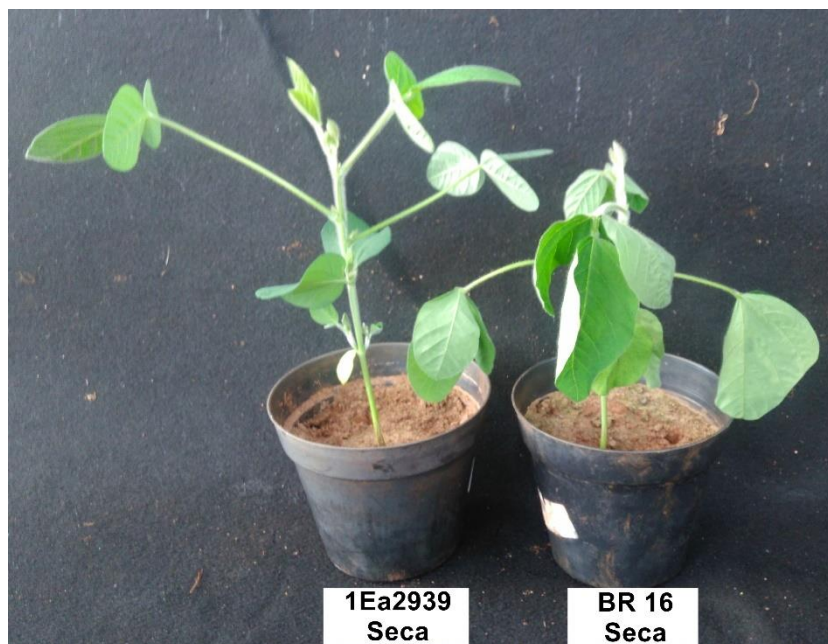


Figura 12. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição de escassez hídrica (déficit hídrico) após 7 dias de experimento.

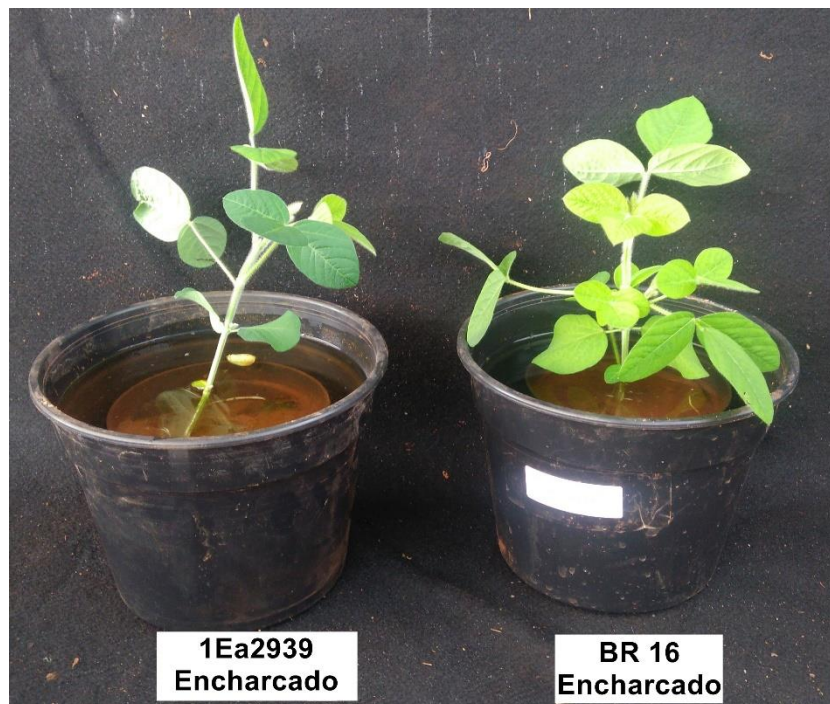


Figura 13. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (1Ea2939) e seu respectivo *background* BR 16 na condição de excesso hídrico (hipóxia) após 7 dias de experimento

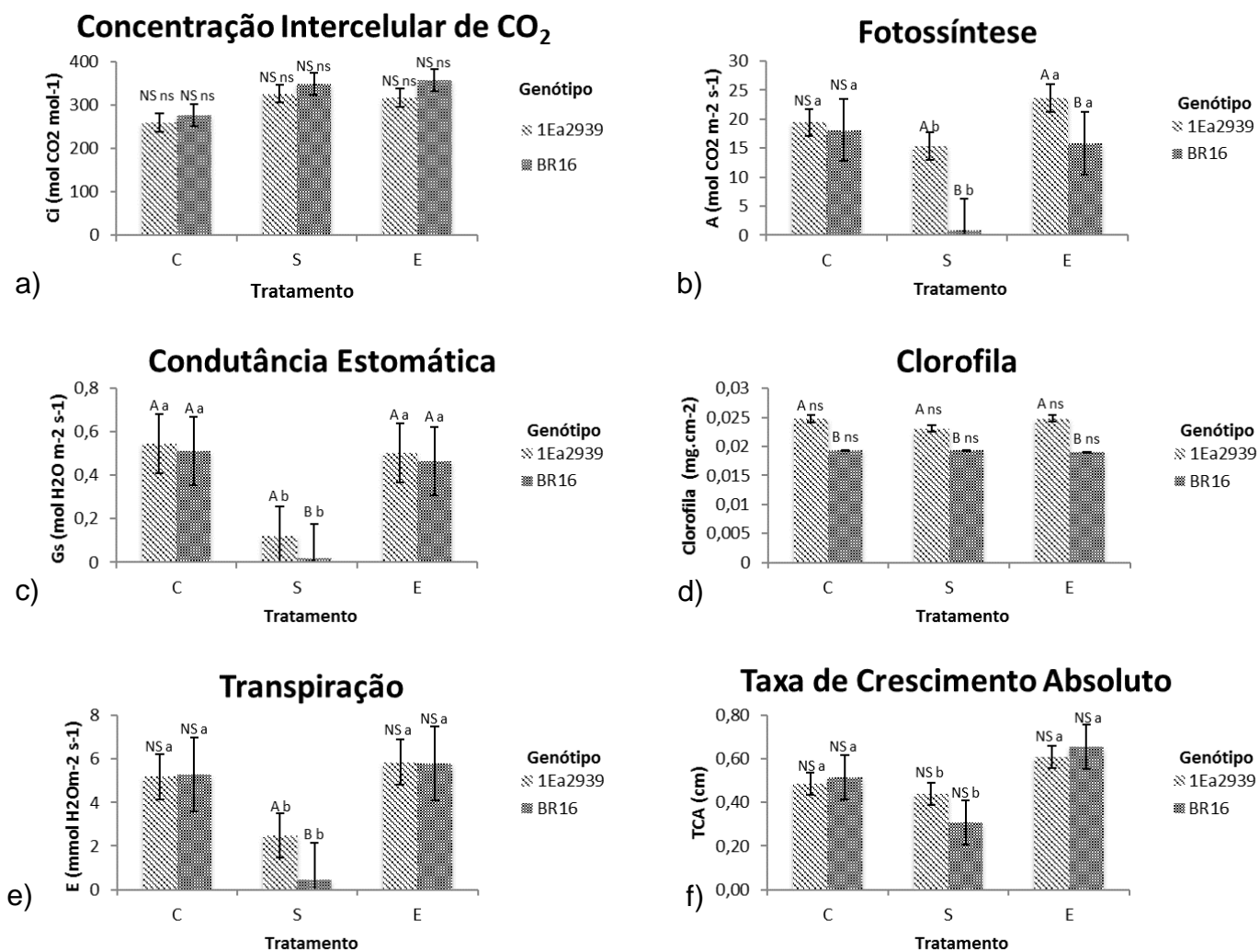


Figura 14. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 1Ea2939 e o seu background BR 16. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para comparação entre genótipo; Letra minúscula para comparação entre tratamento. NS – Não significativo. ANOVA e Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

5.3. Respostas Bioquímicas da Soja expressando a construção 35S-AtAREB1 sob estresse Hídrico

Na comparação de respostas bioquímicas entre a inserção 35S-AtAREB1 (1Ea2939) e seu background BR 16, conforme figura 15, observou-se efeito do genótipo para proteína totais solúveis na folha e raiz, sendo que para ambos os tecidos, observou-se maior concentração de proteína na linhagem transgênica em comparação a cultivar convencional BR16 (Figura 15a; 15d).

Para conteúdo de peróxido de hidrogênio e a atividade da catalase, não foram observadas diferenças nos tecidos da folha, tanto para o efeito de genótipo como para o efeito de tratamento (Figura 15b; 15c). Na raiz, observou-se efeito para o conteúdo de peróxido, sendo que a cultivar BR16 apresentou maiores valores (Figura 15e). Por outro lado, para a enzimas catalase não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos (Figura 15f).

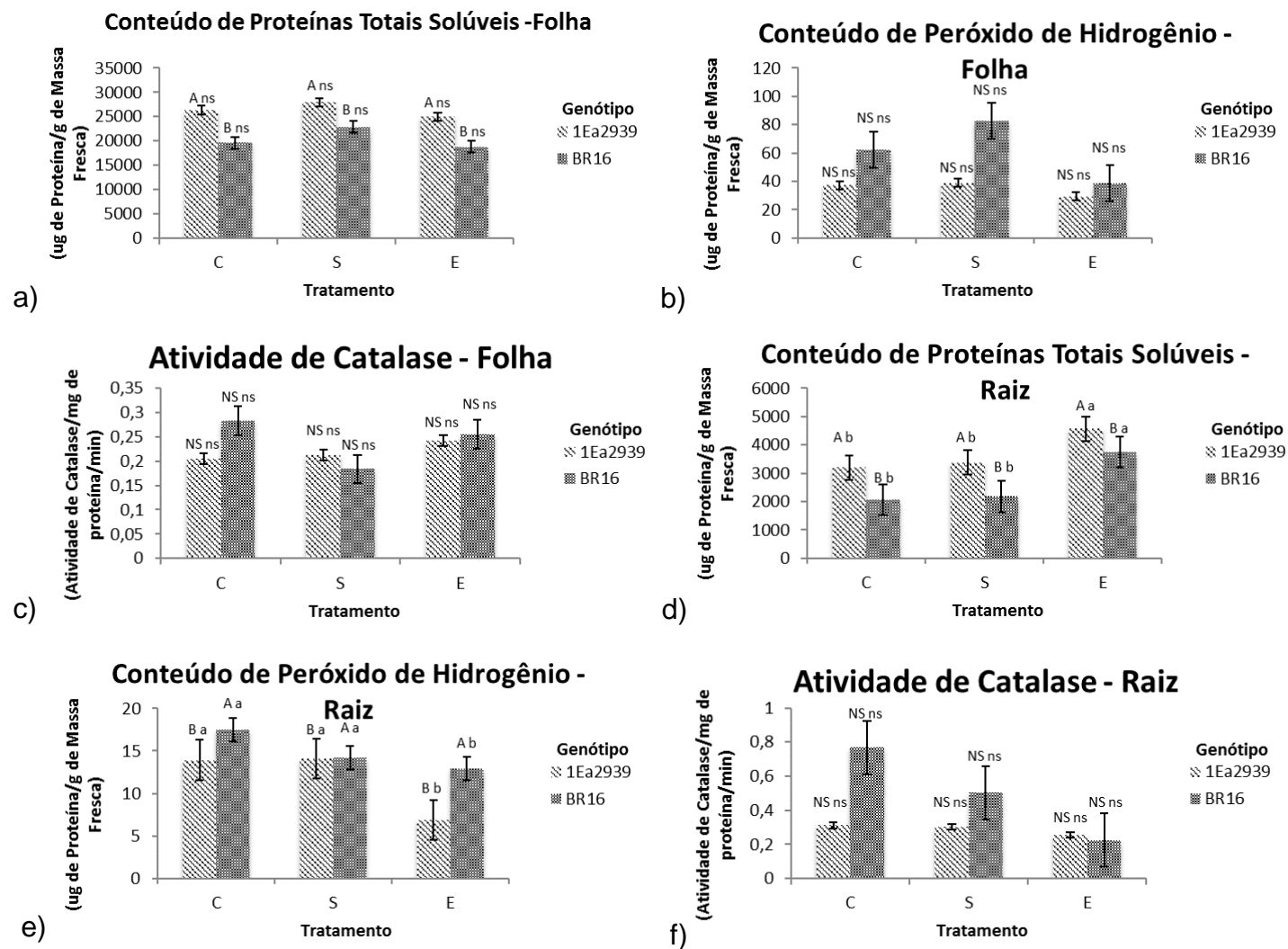


Figura 15. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 1Ea2939 e o seu background BR 16 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

5.4. Efeitos da Inserção 35S-AtGoIS2 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico

Na comparação de respostas fisiológicas entre a inserção 35S-AtGoIS2 (2la4) e seu background BRS 184, observou-se a aparência das plantas nos diferentes tratamentos por registros fotográficos (Figura 16;17;18), e através dos dados de fisiologia foram organizados gráficos conforme Figura 19. Observou-se efeito do tratamento para condutância estomática e taxa de crescimento absoluto. Foi detectada a interação entre genótipo e tratamento para fotossíntese e transpiração. Para concentração interna de CO₂ (Figura 19a) e clorofila (Figura 19d) não se observou efeito de genótipo nem de tratamento.

O tratamento controle apresentou maior condutância estomática, seguido pelo tratamento por excesso hídrico enquanto a déficit hídrico apresentou menor condutância estomática (Figura 19c). Com relação a taxa de crescimento absoluto a déficit hídrico reduziu o crescimento em altura (Figura 19f).

Houve interação entre genótipo e tratamento para fotossíntese no déficit hídrico onde o genótipo 2la4 é inferior que o *background* BRS 184 (Figura 19b). Na transpiração a interação genótipo-tratamento ocorreu no déficit hídrico onde a BRS 184 apresentou valores superiores que o genótipo transgênico (Figura 19e).

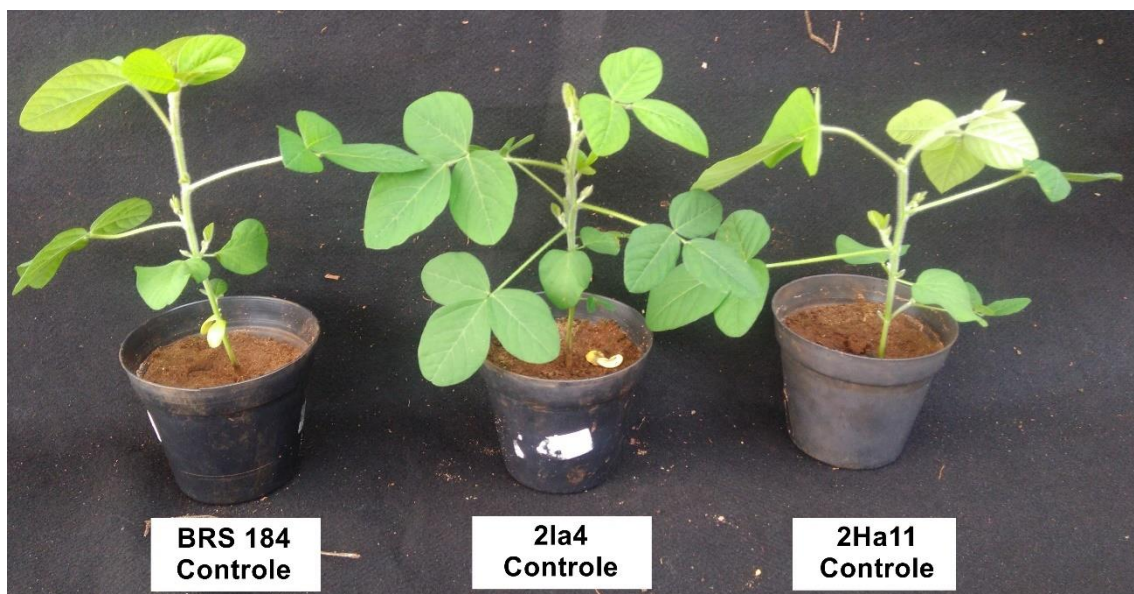


Figura 16. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2la4 e 2Ha11) e seu respectivo *background* BRS 184 na condição de controle após 7 dias de experimento

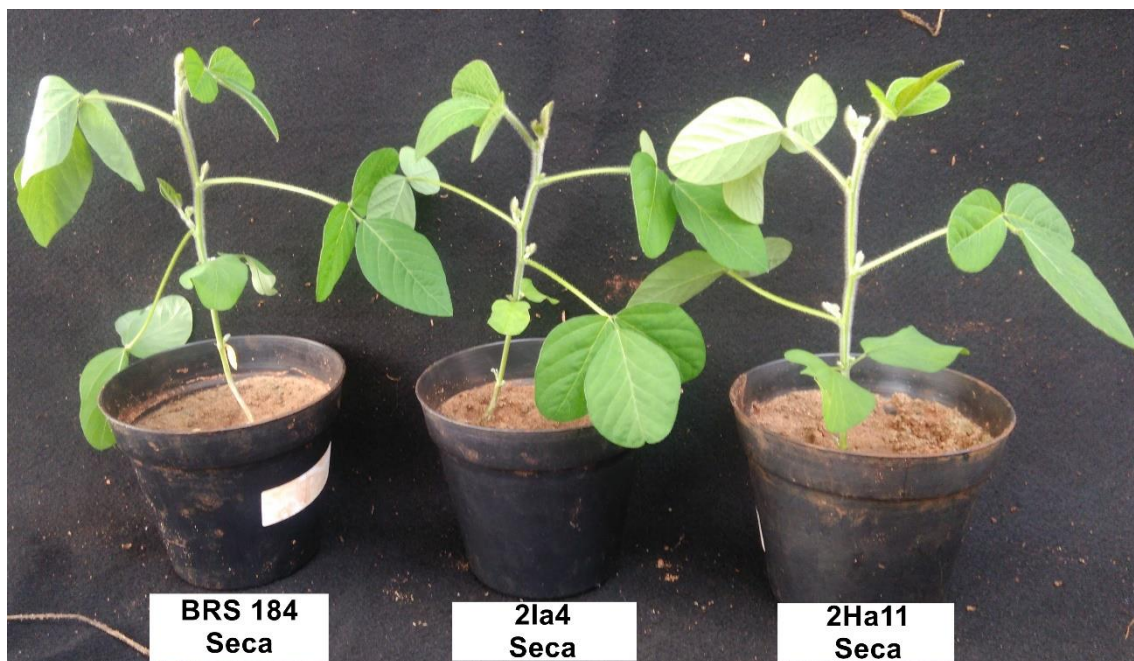


Figura 17. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2la4 e 2Ha11) e seu respectivo *background* BRS 184 na condição de escassez hídrica (déficit hídrico) após 7 dias de experimento



Figura 18. Aspecto observado nas plantas de soja transformada (2la4 e 2Ha11) e seu respectivo *background* BRS 184 na condição de excesso hídrico (encharcamento) após 7 dias de experimento

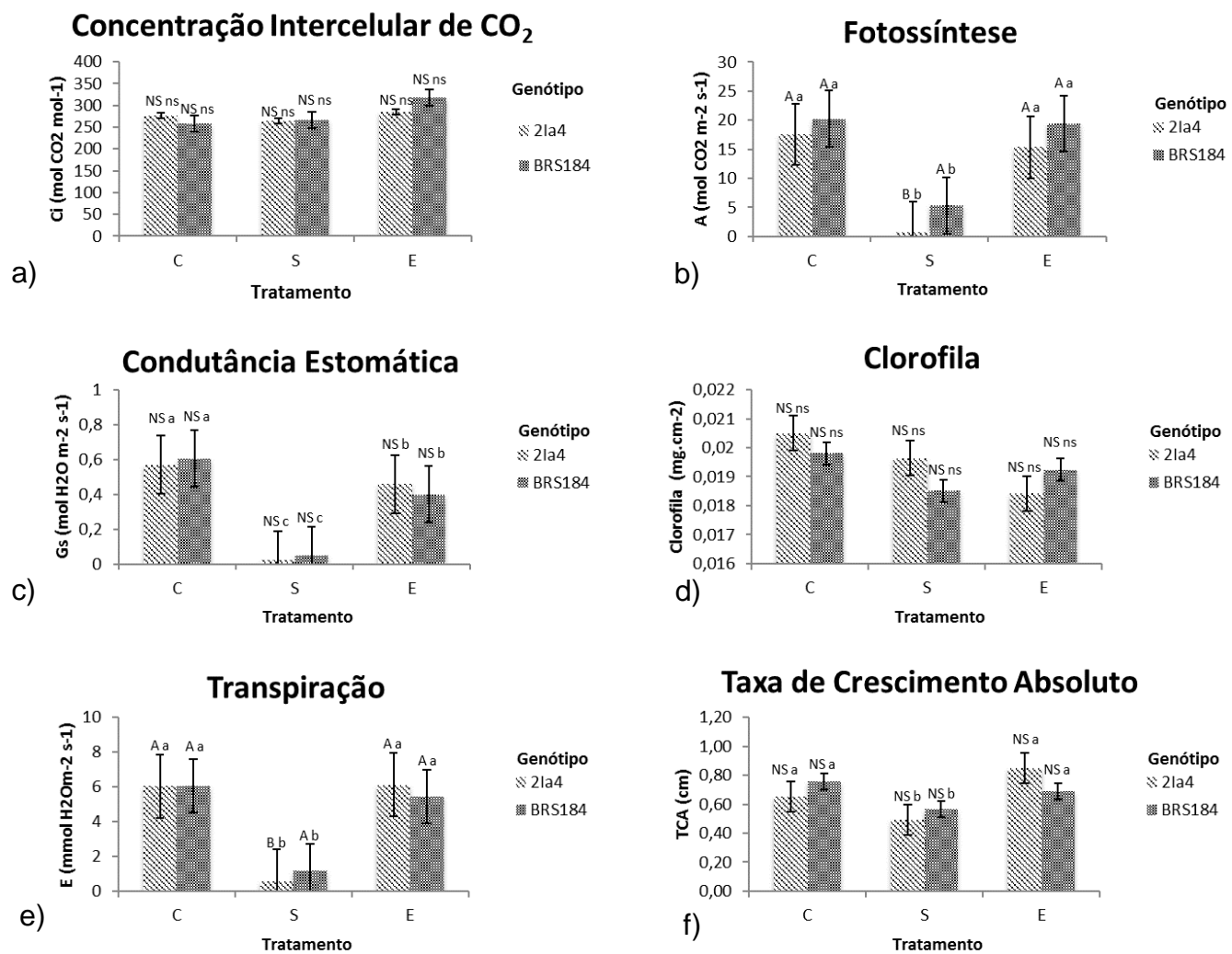


Figura 19. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 2la4 e o seu background BR 184. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

5.5. Efeitos da Inserção 35S-AtGolS2 nas Respostas Bioquímicas da Soja por Estresse Hídrico

Na comparação de respostas bioquímicas entre a inserção 35S-AtGolS2 (21a4) e seu background BR 16, conforme figura 20, observou-se efeito do tratamento para catalase na folha e na raiz.

Para atividade de catalase na folha houve maior atividade no controle, seguido pelo excesso hídrico menor atividade no déficit hídrico (Figura 20c), porém na raiz houve uma menor atividade de catalase no excesso hídrico enquanto o controle e déficit hídrico permaneceram equivalentes (Figura 20f).

Para os outros parâmetros os dados não foram significativos (Figura 20a; 20b; 20d; 20e).

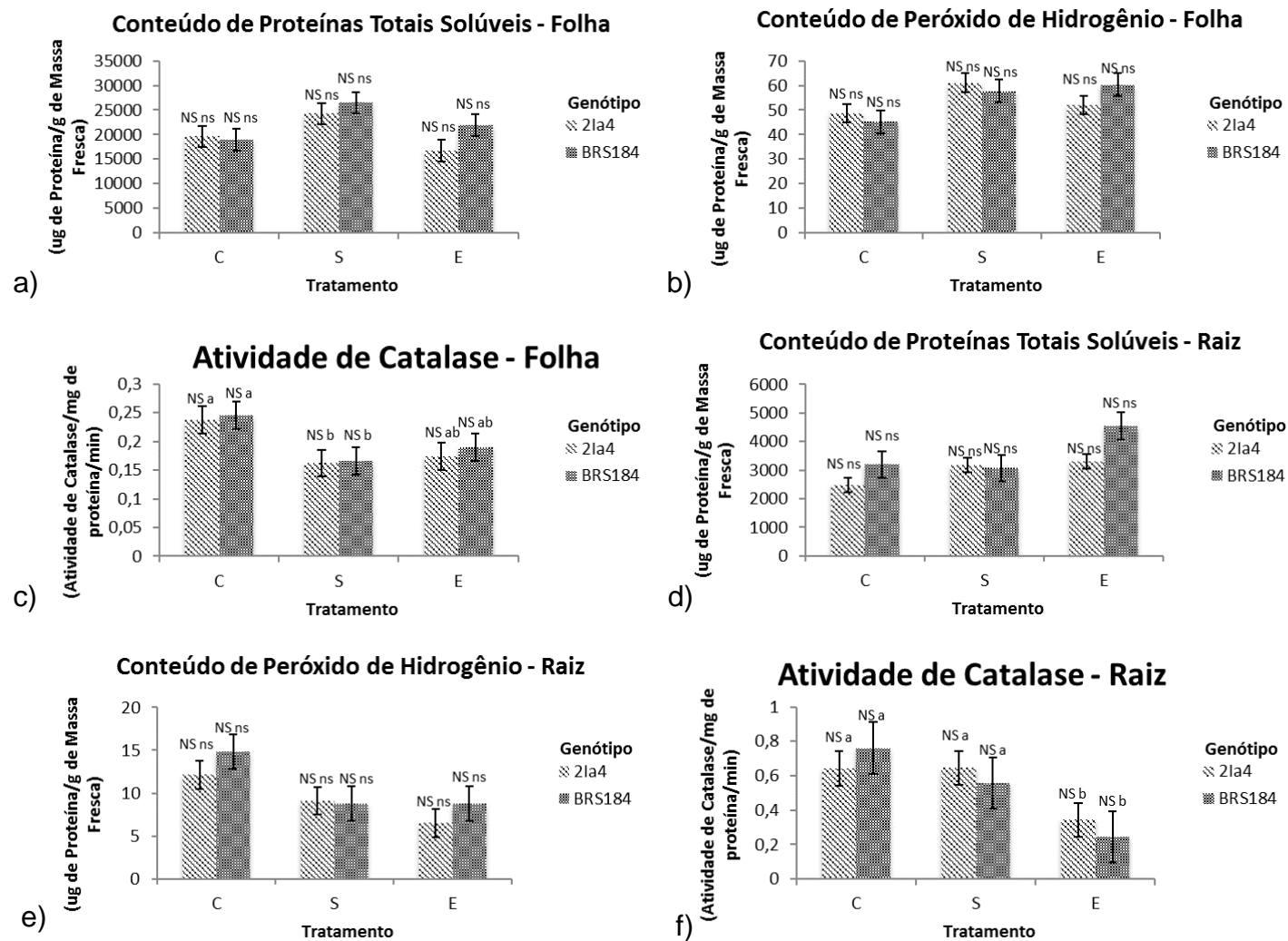


Figura 20. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 21a4 e o seu background BR 184 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

5.6. Efeitos da Inserção 35S-AtNCED3 nas Respostas Fisiológicas da Soja por Estresse Hídrico

Na comparação de respostas fisiológicas entre a inserção 35S-AtNCED3 (2Ha11) e seu background BRS 184, observou-se o a aparência das plantas nos diferentes tratamentos (Figura 16;17;18)

Nas variáveis fisiológicas, observou-se efeito do genótipo apenas para o conteúdo de clorofila, onde a cultivar convencional 184 apresentou mais conteúdo de clorofila em comparação a linhagem transgênica (Figura 21b).

Com relação as demais variáveis fisiológicas (fotossíntese, condutância, transpiração), foi observado efeito apenas do estresse, sendo que a déficit hídrico apresentou resultados inferiores para essas variáveis em relação aos demais tratamentos (Figuras 21a;21c;21d). A condutância estomática diferiu tanto no déficit hídrico como no encharcamento.

As variáveis concentração intercelular de CO₂ e TCA, não apresentaram efeitos significativos de tratamento nem de genótipo.

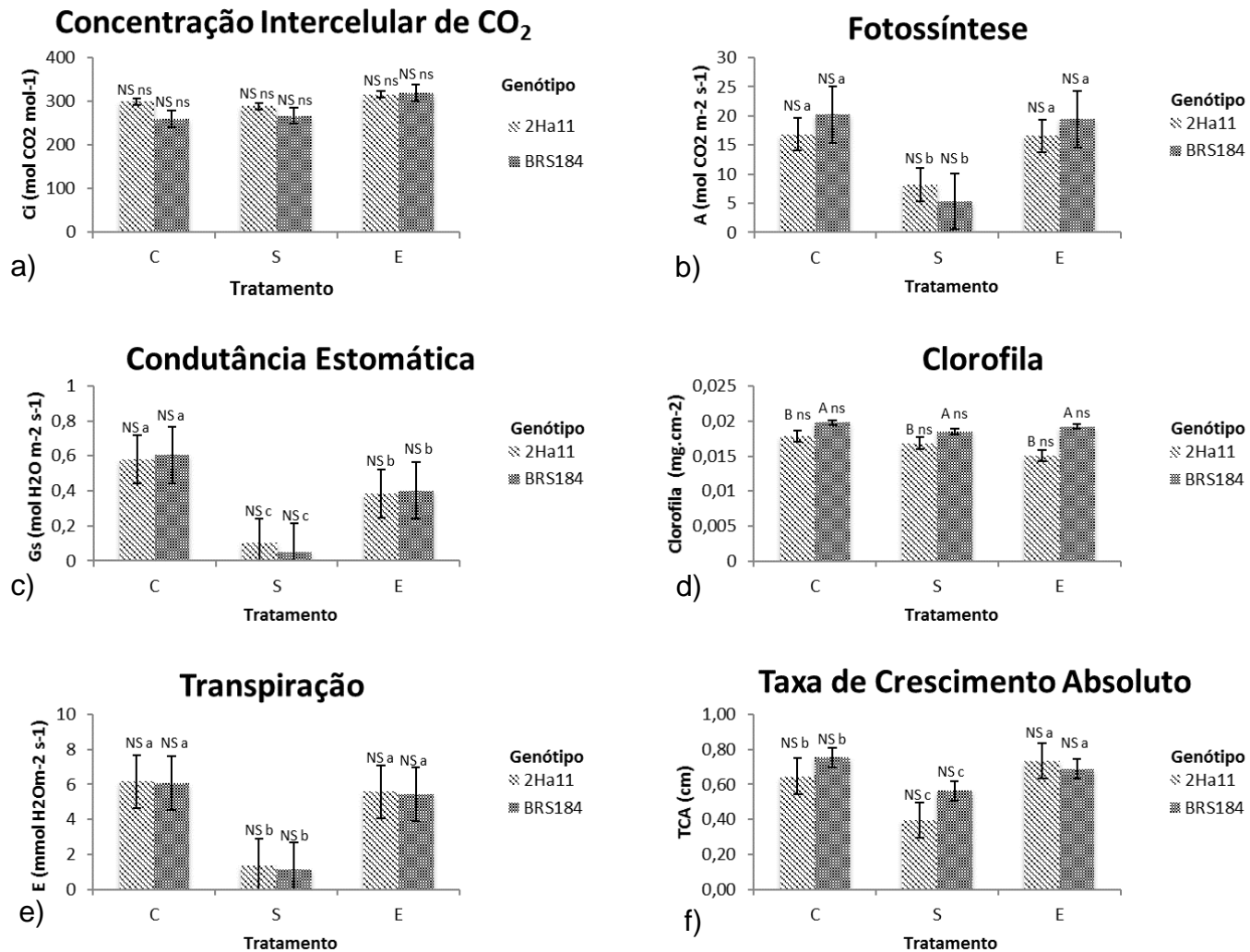


Figura 21. Gráficos dos resultados dos parâmetros fisiológicos observados entre o genótipo transgênico 2Ha11 e o seu background BR 184. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

5.7. Efeitos da Inserção 35S-AtNCED3 nas Respostas Bioquímicas da Soja por Estresse Hídrico

Na comparação de respostas bioquímicas (concentração de proteína, conteúdo de peróxidos e atividade da catalase), entre a inserção 35S-AtNCED3 (2Ha11) e seu background BRS 184, não foram observadas diferenças nem para genótipo e nem para tratamento, nos tecidos de folhas (Figuras 22a; 22b; 22c). Para raiz, observou-se efeito de genótipo para proteína total e catalase, sendo que a proteína foi maior na cultivar convencional em comparação a linhagem transgênica. O oposto foi observado para a atividade da catalase (Figura 22f).

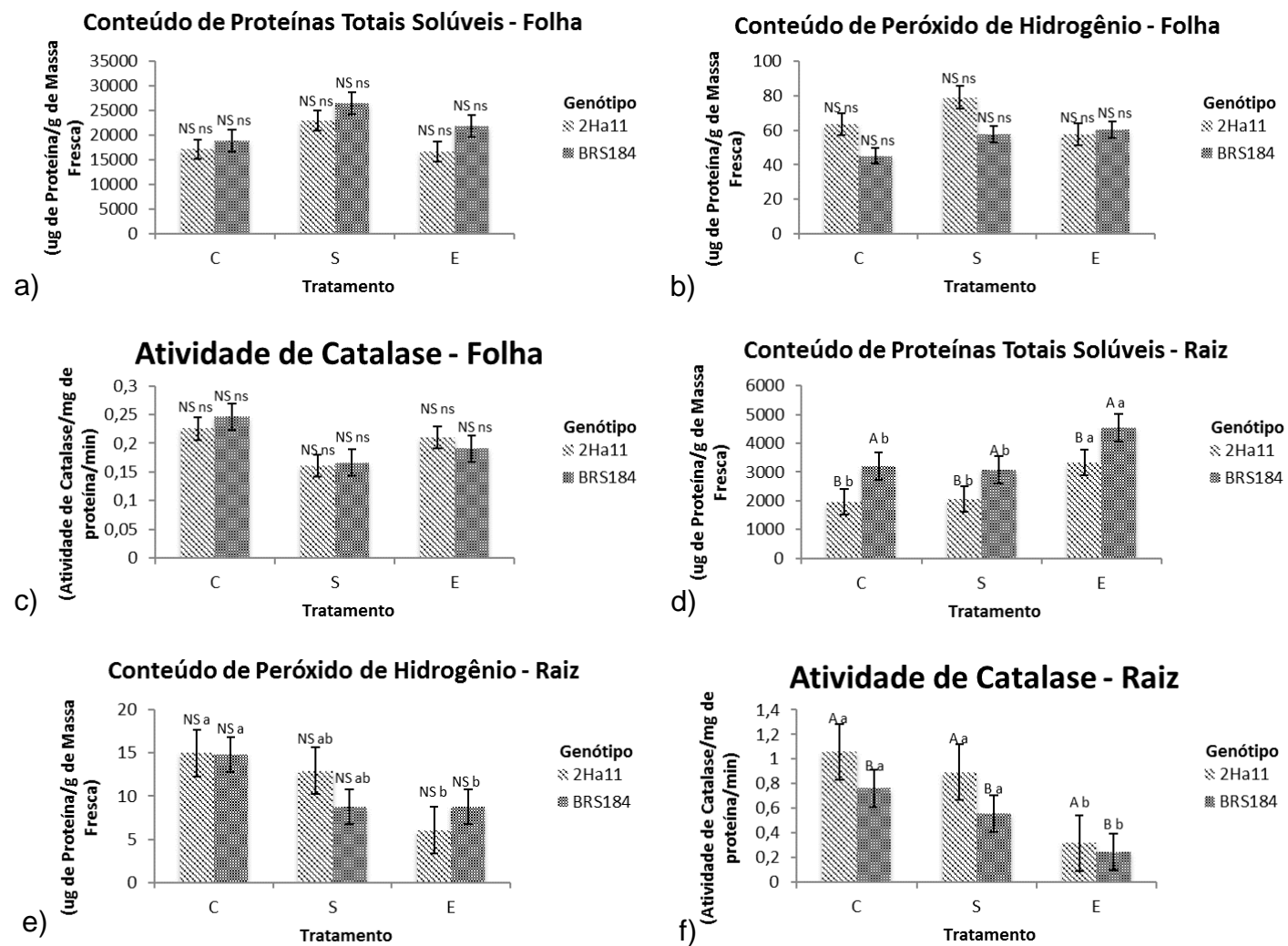


Figura 22. Gráficos dos resultados dos parâmetros bioquímicos observados entre o genótipo transgênico 2Ha11 e o seu background BR 184 em amostras de folha e raiz. C – Controle; S – Déficit hídrico; E – Encharcamento. Letra maiúscula para Genótipo; Letra Minúscula para tratamento. NS – Não significativo. Teste de Tukey HSD 5% de probabilidade

6. Discussões

Considerando os dados obtidos pelo Gene Sifter (Tabela 6), do total de 18823 genes diferencialmente expressos no excesso hídrico e dos 5422 genes diferencialmente expressos no déficit hídrico, 2491 genes eram expressos igualmente em ambos os estresses. Esses dados corroboram com o forte indício da existência de uma sinalização cruzada para os estresses abióticos por disponibilidade hídrica. Tais resultados podem ser comparados com do estudo realizado por CHEN et al. (2016) que demonstrou que aproximadamente 2742 genes foram expressos exclusivamente déficit hídrico bem como 3498 foram diferencialmente expressos no encharcamento, sendo que destes 823 genes foram comuns para as duas condições (461 *up* regulados e 290 *down* regulados), indicando que existe tal correlação de genes.

Através dos mapas genéticos feitos através dos genes diferencialmente expressos obtidos no Gene Sifter, que pode observado na Figura 8 e Figura 9, a maioria dos genes fazem partes da família Cytochrome P450, responsável pela biossíntese de produtos secundários e hormônios assim como a desintoxicação por herbicidas (GONZÁLEZ-MENDOZA, 2007), estudos também demonstraram que essa família está envolvida nos processos de biossíntese de e brassinoesteroides e na regulação de seus níveis endógenos, os brassinoesteroides são responsáveis pela regulação de numerosos genes envolvidos no controle de crescimento e desenvolvimento da planta bem como apresenta função na resposta ao estresse abiótico e biótico (CLOUSE; SASSE, 1998). Outra família que apresenta numerosos genes é a UDP Glycosyltransferases responsável pela modificação da expressão dos brassinoesteroides (OSTROWSKI; JAKUBOWSKA, 2014). Já a família das glicosídeas age formação de intermediários na lignificação da parede celular, na degradação no endosperma durante a germinação, ativação de fito hormônios e principalmente na ativação de compostos químicos de defesa contra estresses bióticos e abióticos (MORANT et al., 2008).

Uma família de significativa importância para o estresse abiótico é a família das peroxidases que são enzimas antioxidantes responsáveis por

prevenir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) na planta que são formados essencialmente durante o estresse abiótico e biótico (BARBOSA et al., 2014). Com o aumento do estresse, a formação de ROs é intensificada e sua eliminação deve ocorrer de forma constante para evitar o estresse oxidativo que prejudica diversos aspectos da planta, principalmente a produtividade. Desta forma, a ação sincronizada das enzimas, como a catalase, são responsáveis pela remoção das EROs confere maior tolerância as plantas sob condições de estresse (GRATÃO et al., 2005).

Para os parâmetros fisiológicos a concentração intercelular de CO₂ não se demonstrou um bom parâmetro para diferenciação de genótipo e tratamento, visto que não apresentou diferença entre nenhum dos genótipos nem tratamento.

Considerando os efeitos dos tratamentos, o efeito do estresse por déficit hídrico exibiu mais impactos por reduzir parâmetros fisiológicos como crescimento, fotossíntese, condutância estomática e transpiração, em todos os genótipos estudados.

Quanto ao tratamento de excesso hídrico só pode se diferenciar os genótipos relação ao parâmetro de taxa de fotossintética onde a linhagem transgênica 1Ea2939, apresentou desempenho superior a cultivar convencional BR16.

Estudos prévios afirmam que o excesso hídrico causa o fechamento estomático que resulta numa redução da fotossíntese (CAUDLE; MARICLE, 2012), nesse estudo o efeito do excesso hídrico na condutância estomática foi observado em duas das três linhagens transgênicas avaliadas e pode ser (Figura 19c; 21c).

O genótipo 1Ea2939 para os parâmetros fisiológicos (Figura 14) apresentou maior conteúdo de clorofila em todos os tratamentos, o que pode explicar a maior taxa fotossintética desse genótipo nos tratamentos de déficit hídrico e encharcamento,

Nos parâmetros bioquímicos (Figura 15) o genótipo 1Ea2939 apresentou maior conteúdo de proteínas totais solúveis independente do tratamento, demonstrando que a inserção do transgene alterou a concentração de proteína no genótipo. Este genótipo também apresentou menor conteúdo de peróxido de hidrogênio na folha e na raiz indicando menor quantidade de espécies

reativas de oxigênio que são produzidas quando a planta se encontra em estresse, tal fator indica que a transgenia conferiu maior adaptabilidade a planta, evitando os impactos causados por essa produção. Com relação a atividade da catalase não houve diferença significativa o que pode indicar a ativação de outros mecanismos de defesa contra ROs.

Os genótipos 2la4 e 2Ha11 não apresentaram desempenho superior na condição de estresse, tanto sob déficit hídrico, como também excesso. Em outros estudos, como no de HONNA *et al.* (2016) a inserção 35S:AtGolS2 apresentou resultados positivos em comparação com o *background* para os parâmetros fisiológicos de condutância estomática e fotossíntese, no entanto nessa pesquisa o déficit hídrico foi aplicado por um período de 21 dias. Um fator que pode ter influenciado para que essas diferenças não fossem observadas nesse estudo, é o período de exposição ao estresse que foi de apenas 7 dias.

Nesse estudo, a duração do estresse foi determinada com base na cultivar BR16, mais sensível ao estresse. e considerado padrão de sensibilidade ao déficit hídrico (FUGANTI-PAGLIARINI, *et al.*, 2010). Dessa forma, a realização de estudos futuros, em que as plantas permaneçam por um período maior sob estresse, pode contribuir para a observação de diferenças entre as demais linhagens GM, além da 1Ea2939.

7. Perspectivas Futuras

7.1. Atividades Realizadas

Avaliações complementares que podem ajudar a explicar as diferenças observadas principalmente na linhagem 1Ea2939 estão sendo conduzidas. Entre essas avaliações, inclui-se a avaliação da expressão gênica por meio de PCR em tempo real. Será avaliado se ocorre a indução do transgene na situação de estresse, além do gene codificador da enzima álcool desidrogenase e da biossíntese de prolina, tendo em vista que esses genes se constituem em bons candidatos para detectar a ocorrência de estresse por excesso hídrico e déficit hídrico respectivamente. Algumas das atividades já realizadas encontram-se descritas a seguir.

7.1.1. Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir das amostras maceradas extração de RNA, objetiva diferenciar a expressão gênica das plantas em diferentes situações, sendo assim durante a realização do estágio foi realizada extrações de RNA com o intuito de comparar a expressão gênica de plantas de soja GM das convencionais.

O protocolo utiliza como tampão de extração o reagente Trizol[®], e duas lavagens utilizando clorofórmio (Figura 26), em seguida são adicionados solução 'high salt' e isopropanol, por fim é adicionado etanol 75% e após essa etapa o pellet é seco e dissolvido em água livre de RNase e DNase durante aproximadamente duas horas, permitindo que o RNA seja ressuspendido. Para garantir a eficácia da extração é realizada mais uma etapa de limpeza que consiste na adição de acetato de sódio e etanol 100%, e mais uma etapa com adição de etanol 75%, para finalmente secar o pellet e ressuspende-lo em água livre de RNase e DNase.

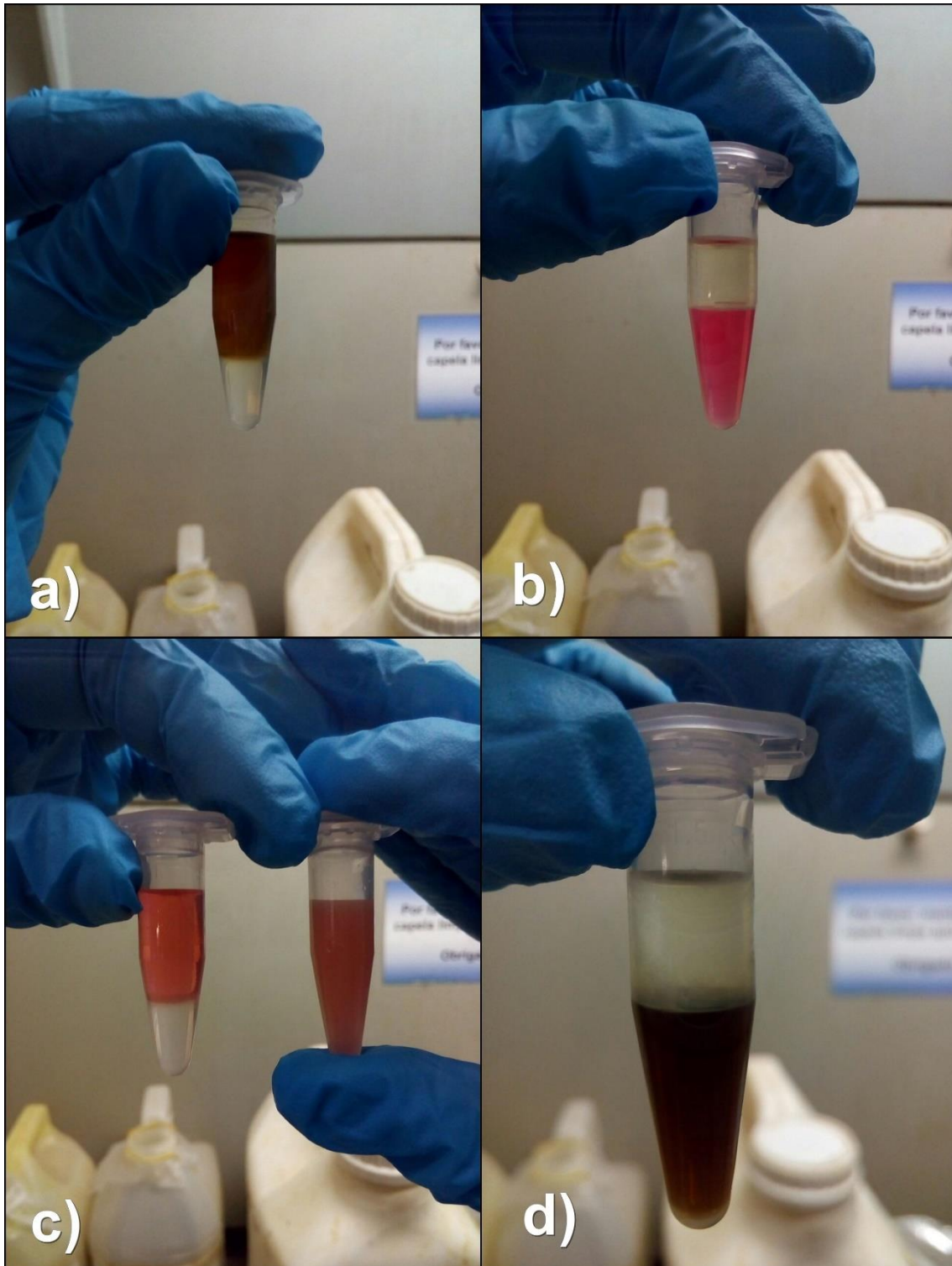


Figura 23. a) Amostra de folha com adição de Trizol. b) Amostra de raiz com adição de clorofórmio. c) Amostra de raiz com segunda lavagem por clorofórmio após agitação no vórtex. d) Amostra de folha após centrifugação, sendo a parte retirada o sobrenadante e o pellet descartado.

7.1.2. Quantificação das Amostras (Nanodrop)

Após a etapa de extração do RNA, as amostras foram quantificadas (ng/ μ L) em NanoDrop 1000™, utilizando 1 μ L de amostra, através do aparelho observamos além das quantidades de RNA extraído pode se amostras apresentavam contaminações utilizando os valores das razões de absorbância A280/A260 e A260/A23. Usou-se parâmetros como concentrações acima de 200ng/ μ L, para seguir com as análises.

7.1.3. Gel de Integridade

Utilizando as amostras de RNA obtidas da extração que alcançaram parâmetros de absorbância e quantidade de RNA por uL de valor desejável realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a integridade do RNA após a extração (Figura 24).

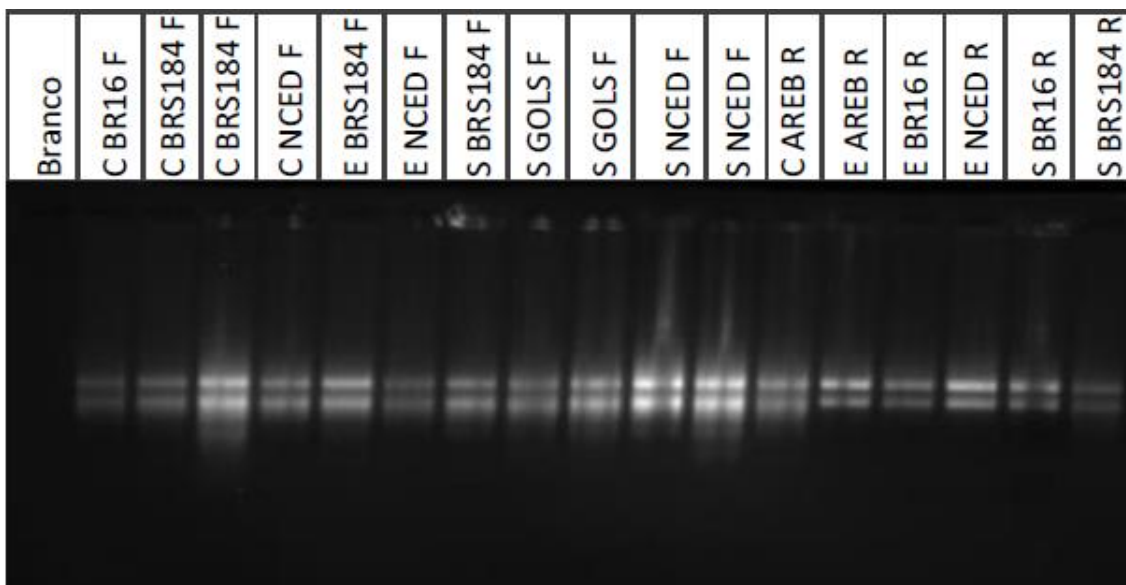


Figura 24. Gel de integridade do RNA extraído. Gel de Agarose 1% Tampão TAE. Marcador 1Kb Plus. C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

7.1.4. Tratamento com DNase

As amostras cujos resultados anteriores de quantificação, absorbância e integridade em gel de agarose se demonstraram satisfatórios foram aliqüotadas para 500 ng/uL e tratadas com kit de DNase I (Invitrogen™) para eliminar DNA exógeno contido na amostra após a extração, para que a síntese de cDNA fosse satisfatória a partir das amostras de RNA extraídas. O tratamento é realizado pela adição de 1µL de tampão específico para DNase e 1µL da enzima DNase, em seguida as amostras são deixadas a aproximadamente 22° no termociclador durante 15 minutos, por fim é feita adição de 1µL de EDTA para interromper a ação da enzima, evitando assim a degradação do RNA amostral.

7.1.5. PCR com Primer β -Actina

Para confirmar a eficiência do tratamento com DNase foi realizada uma PCR convencional utilizando o primer da β -Actina não exógeno, o qual amplifica um intron presente no DNA. Após a PCR, é realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando o produto da PCR, em caso de presença de DNA na amostra o gel apresentará uma banda na altura de 500pb do marcador molecular 1kB Plus (Figura 25).

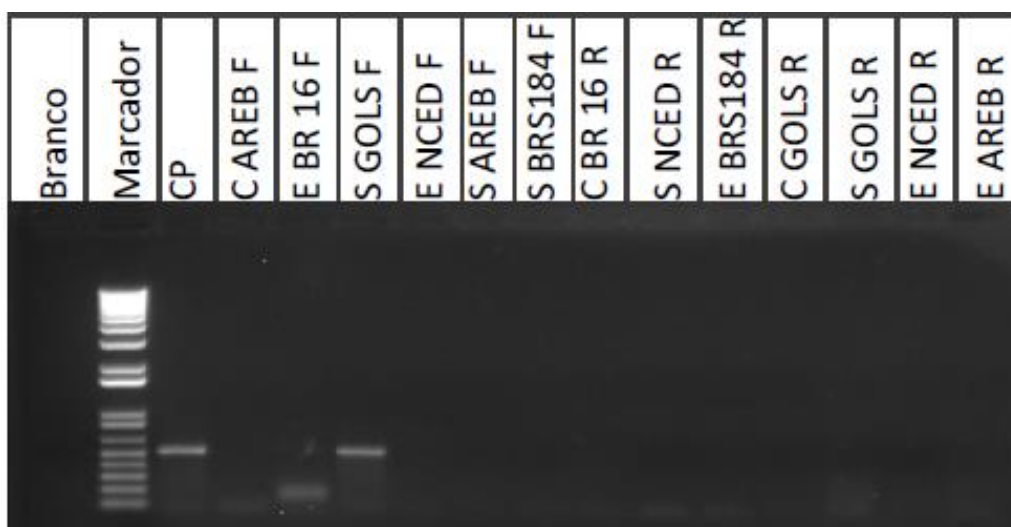


Figura 25. Gel de produto de PCR da β -Actina onde a amostra S GOLS F apresentou DNA após tratamento com DNase e as demais amostras se mostraram negativas. Gel de Agarose

1% Tampão SB. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

7.1.6. Gel de Qualidade do RNA Tratado

Posteriormente é realizada novamente uma eletroforese em gel de agarose a 1% com a amostra tratada de RNA para verificar se o tratamento utilizando DNase não foi prejudicial ao RNA acarretando em sua degradação, visto que a DNase após degradar o DNA na amostra pode vir a ocasionar a degradação do RNA (Figura 26).

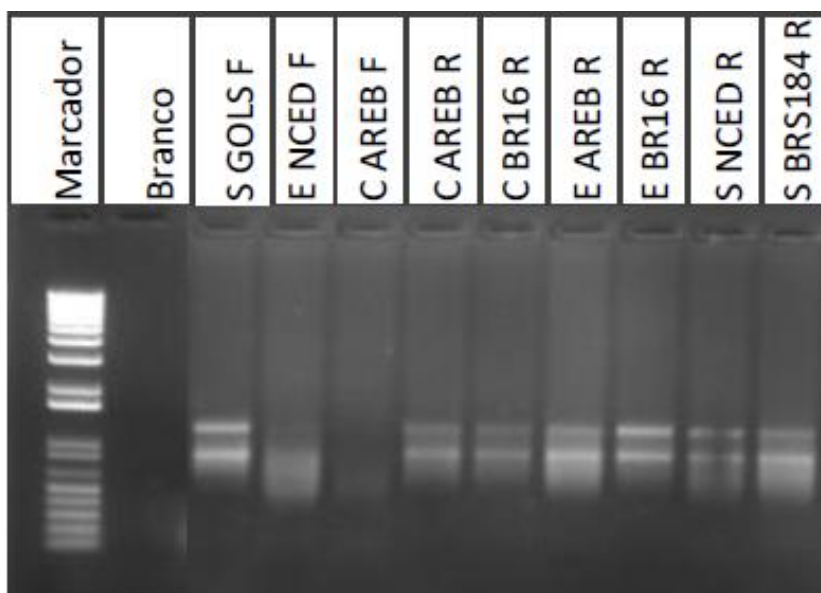


Figura 26. Gel de Qualidade do RNA após tratamento com DNase, observou-se degradação das amostras E NCED F e C AREB F enquanto as demais mantiveram sua integridade pós tratamento. Gel de Agarose 1% Tampão TAE. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

7.1.7. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando alíquotas tratadas com DNase contendo 1000 ng/uL, para isso utilizou-se o kit SuperScript III® (Invitrogen™). Novamente uma PCR com o primer da β -Actina não exógeno foi realizada para verificar se houve a síntese do cDNA sendo que quando o cDNA é sintetizado ele é amplificado pelo primer e apresenta banda no gel de eletroforese (Figura 27).

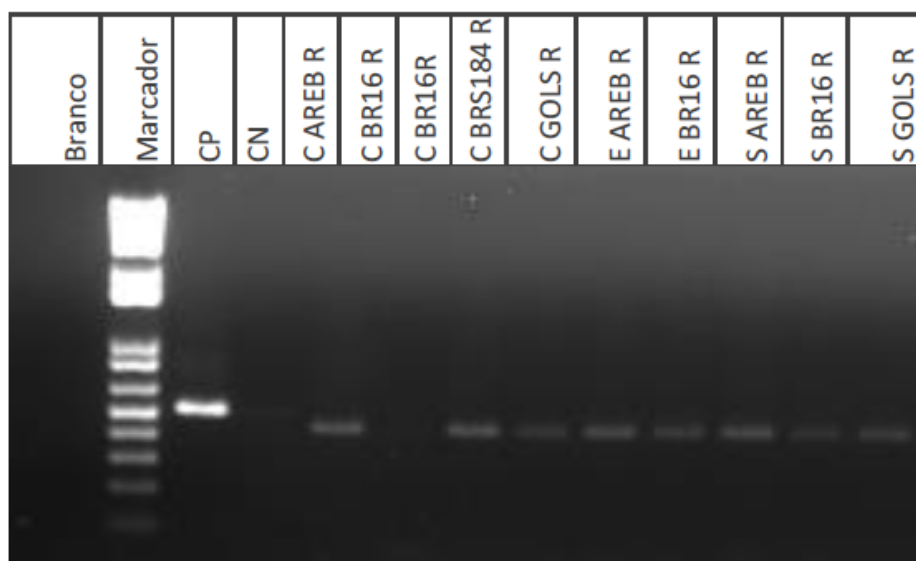


Figura 27. Gel de produto de PCR de β -Actina após a síntese de cDNA, onde era esperado o aparecimento de banda na posição de 512kb, somente a amostra C BR16 R se mostrou negativa. Gel de Agarose 1% Tampão SB. Marcador 1Kb Plus. CP – Controle Positivo; CN – Controle Negativo; C – Controle; E – Encharcado; S – Déficit hídrico; F – Folha; R – Raiz.

7.2. Atividades Previstas

7.2.1. qRT-PCR

Utilizando o cDNA será feito PCR em tempo real quantitativo para verificar a expressão utilizando primers com relação ao estresse abiótico, sendo utilizado o primer para o transgênese de cada GM, primer da ADH, primer da prolina e outros a serem definidos.

8. Considerações finais

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com estudos prévios que indicam a existência de sinalização cruzada entre déficit hídrico e encharcamento.

Entre as linhagens GM para a tolerância a déficit hídrico, a que apresentou maiores diferenças nas condições de estresse por déficit hídrico e excesso hídrico foi a linhagem 1Ea2939, que apresentou melhores respostas para a maioria das variáveis fisiológicas na condição de déficit hídrico, e para a fotossíntese e clorofila na condição de encharcamento.

Os demais genótipos, necessitam ser testados por meio de novos ensaios com diferentes períodos de exposição ao estresse.

Avaliações complementares por meio de avaliação da expressão gênica poderão auxiliar a explicar as diferenças observada.

Referências Bibliográficas

ABIOVE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE OLÉOS VEGETAIS. **Importância Econômica e Social da Soja**. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=importancia-economica-e-social&area=NC0yLTI=>>>.

AGRAWAL, A. A.; FISHBEIN, M. Plant Defense Syndromes. **Ecology**, v. 87, n. 7, p. 132–149, 2006.

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALI, N. Soybean Processing and Utilization. In: GURIQBAL SINGH (Ed.). . **The Soybean: Botany, Production and Uses**. India: Department of Plant Breeding and Genetics, Punjab Agricultural University, Ludhiana, 2010. p. 345–347.

ANACHE, J. A. A. et al. Assessment of methods for predicting soil erodibility in soil loss modeling. **Geociências**, v. 34, n. 1, p. 32–40, 2015.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247–1257, 1995.

ARIAS, Carlos A. Arrabal; OLIVEIRA, Marcelo F.; PÍPOLO, Antônio E.; CARNEIRO, Geraldo Estevam S.; MOREIRA, José Ubirajara V.; KASTER, Milton. **Desenvolvimento de Cultivares de Soja com Tolerância a Deficiência Hídrica**. Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas. **Anais...2007**

BAILEY-SERRES, J.; LEE, S. C.; BRINTON, E. Waterproofing Crops: Effective Flooding Survival Strategies. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1698–1709, dez. 2012.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BENKO-ISEPPON, A. M.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. GENOSOJA - The Brazilian Soybean Genome Consortium: High throughput omics and beyond. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. SUPPL.1, p. 1–4, 2012.

BOERMA, H. R. et al. **SOYBEANS: Improvement, Production and Uses Third Edition**. Vol. 16 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2004. 1180 p.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of

Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2331–2341, 2004.

CASAGRANDE, E. C. et al. Déficit Hídrico Em Soja Differential Gene Expression in Soybean During Water Deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 168–184, 2001.

CAUDLE, K. L.; MARICLE, B. R. Effects of Flooding on Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence, and Oxygen Stress in Plants of Varying Flooding Tolerance. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 115, n. 1 & 2, p. 5–18, 2012.

CHEN, W. et al. Identification and Comparative Analysis of Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissue under Drought and Flooding Stress Revealed by RNA-Seq. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. July, p. 1044, 2016.

CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 427–451, 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos**. Observatório Agrícola, v. 3, n. 4, p. 1–60, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_bol_etim_graos_janeiro_2016.pdf> Acesso em: 12 de setembro de 2016.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Monitoramento Agrícola- junho/2016. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, nono levantamento, junho de 2016., v. 3, n. 9, p. 1–174, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_09_00_00_bol_etim_graos_junho__2016_-_final.pdf> Acesso em: 12 de setembro de 2016.

DALL´AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. **Circular Técnica Embrapa Soja**, v. 74, p. 1–20, 2010.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 342, p. 89–97, 2000.

DOSS, B. D. Effect of Soil Water Stress at Various Growth Stages on Soybean Yield. **Agronomy Journal**, v. 66, n. March-April 1974, p. 297–299, 1974.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja Circular Técnica 48 - Embrapa Soja**, 2007.

FAUSTINO, V. A. **IMPACTO DO ESTRESSE HÍDRICO E BIÓTICO (*Anticarsia gemmatalis* HÜBNER , 1818) SOBRE O MECANISMO DE DEFESA DA SOJA**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2015.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of Soybean Development. **Special report**, v. 80, n. March, p. 11, 1977.

FERRARI, E.; PAZ, A. DA; SILVA, A. C. DA. Déficit Hídrico No Metabolismo Da Soja Em Semeaduras Antecipadas No Mato Grosso. **Nativa - Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 67–77, 2015.

FREITAS, M. DE C. M. DE. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, p. 1–12, 2011.

FUGANTI-PAGLIARINI, R. et al. **Análise fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os genes AtDREB1A e AtDREB2A sob déficit hídrico em condições experimentais de campo**. 2010

GAVA, R. **Os efeitos do estresse hídrico na cultura da soja (Glycine Max,(L.) Merrill)**. Universidade de São Paulo, 2014.

GOLDSMITH, P. D. **Economics of Soybean Production, Marketing, and Utilization**. Elsevier Inc. p 117-150, 2008.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D. El complejo enzimático citocromo P450 en las plantas. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 177–183, 2007.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481–494, 2005.

HONNA, P. T. **Obtenção e Caracterização Molecular e Fisiológica de Plantas de Soja Contendo o Gene Atgols2 Sob Déficit Hídrico**. Tese [Mestrado em Genética e Melhoramento de Planta] Universidade Estadual Paulista, 2015.

HONNA, P. T. et al. Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with AtGols2 gene for drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 11, p. 157, 2016.

ITO, T. M. et al. Fatores de transcrição da família ap2/erf e resposta em plantas aos estresses abióticos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, p. 207–214, 2012.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1976.

KULCHESKI, F. R. **IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do SUI, 2013.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4731–4748, 2011.

MAGALHÃES, G. C. **Análise da Atividade de Algumas Enzimas Antioxidantes em Plantas De Soja (*Glycine Max L. Merr.*) Sob Níveis de Manganês, em Função da micorriza arbuscular.** Tese (Mestrado em Agronomia) p. 122, 2002.

MAPA. **PIB da agropecuária tem alta de 1,8% em 2015.** p. 2015–2016, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/03/pib-da-agropecuaria-tem-alta-de-1porcento-em-2015>> Acesso em: 23 de outubro de 2016.

MARIN, S. R. R. **Identificação De Regiões Promotoras De Genes Expressos Em Soja Sob Déficit Hídrico.** Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina, 2014.

MARINHO, J. P. **Caracterização de Respostas Moleculares e Fisiológicas de Plantas de Soja Geneticamente Modificadas Super Expressando o Fator Atareb1 Sob Déficit Hídrico.** Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, 2014.

MISSIO, E. L. et al. Desempenho de genótipos de soja em solo hidromórfico de várzea. **Revista de Pesquisa Agropecuária Gaúcha** v. 16, n. 21, p. 23–29, 2010.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 86–96, 2012.

MOLINARI, M. D. C. **Caracterização de Soja Geneticamente Modificada com 35S:AtNCED3 sob Condições de Déficit hídrico.** Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Londrina, 2016.

MONTEIRO, J. E. B. A. **Agrometeorologia dos Cultivos: O fator meteorológico na produção agrícola.** Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Brasília - DF. 2009.

MORANT, A. V. et al. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1795–1813, 2008.

MOREIRA, M. G. Soja-Análise da Conjuntura Agropecuária. **Departamento de Economia Rural**, v. 435, n. 41, p. 1–17, 2012.

MUNDSTOCK, C. M. **SOJA: Fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 31p. 2005.

NAKAYAMA, T. J. **ESTRATÉGIAS DE PROSPECÇÃO GÊNICA E TRANSFORMAÇÃO EM PLANTAS PARA TOLERÂNCIA À HIPÓXIA.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

OLIVEIRA, A. B. **Fenologia, Desenvolvimento e Produtividade de**

Cultivares de Soja em Função de Épocas de Semeadura e Densidades de Plantas. Tese (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de São Paulo. 2010. 90p.

OSTROWSKI, M.; JAKUBOWSKA, A. UDP-Glycosyltransferases of Plant Hormones. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 43–60, 2014.

PASSOS, E. E. M. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica.** Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000gix1kou302wx5ok05vadr1lvrngh5.html>>. Acesso em: 21 de outubro de 2016.

PAZ, M. M. et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 206–213, 2006.

RIBEIRO, J. M. **Prospecção De Genes De Soja Expressos Sob Condições De Déficit Hídrico.** Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina. 2011;

RIO, A. DO. **Aquecimento global - impacto na produtividade da cultura da soja e ações estratégicas de manejo para sua minimização em diferentes regiões produtoras do Sul do Brasil.** Tese (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo, 2014.

ROCHA, R. S. **Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude.** Tese (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Piauí. Teresina. p. 59, 2009.

RODRIGUES, L. V. et al. **Teor de clorofila e NDVI de soja em resposta ao ataque do percevejo-marrom, Euschistus Hero.** Londrina. Embrapa Soja, , 2012.

SCHMUTZ, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–83, 2010.

SILVA, C. A. S. et al. Drenagem Superficial para Cultivos Rotacionados em Solos de Várzea. **Circular Técnica - Embrapa Clima Temperado**, v. 1, p. 1–23, 2008.

SILVA, M. S. et al. Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571–576, 2006.

SILVENTE, S.; SOBOLEV, A. P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. October, p. 895, 2015.

SIONIT, N.; KRAMER, P. J. Effect of Water Stress During Different Stages of Growth of Soybean1. **Agronomy Journal**, v. 69, n. 2, p. 274, 1977.

SOUSA, C. A. F. DE; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **J. Plant Physiol. Braz. J. Plant Physiol**, v. 14, n. 142, p. 83–9483, 2002.

SOUZA, C. A. et al. Arquitetura de plantas e produtividade da soja decorrente do uso de redutores de crescimento. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 634–643, 2013.

SYED, N. H. et al. Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 22, p. 7129–7149, 2015.

TAJI, T. et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 29, n. 4, p. 417–426, 2002.

TEIXEIRA, N. C. **MOLIBDÊNIO E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia). Centro Universitário de Goiás - Anhanguera. 27p. 2013.

THEISEN, G. et al. Manejo da Cultura da Soja em Terras Baixas em Safras com El-niño. **Circular Técnica - Embrapa Clima Temperado**, v. 82, p. 1–3, 2009.

TRENTIN, R. et al. Subperíodos fenológicos e ciclo da soja conforme grupos de maturidade e datas de semeadura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 703–713, 2013.

UMEZAWA, T. et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 113–122, 2006.

VIEIRA, F. C. F. et al. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de cultivares de soja submetidos a déficit hídrico induzido por peg 6000. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 543–552, 2013.

ZHANG, M.; YUAN, B.; LENG, P. Cloning of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene and the role of ABA on fruit ripening. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. May, p. 460–463, 2009.

APÊNDICE A

Curva Padrão de BSA para Cálculo de Enzimas Totais Solúveis

Após a quantificação da solução padrão de BSA obteve-se o gráfico com 11 pontos relacionando absorbância com concentração da solução (Figura 12) e $R^2 = 0,9858$ que indica a proporção de variância na variável dependente que é previsível através da variável independente. Quanto mais próximo de 1 for o R^2 melhor será a qualidade da curva, pois mais precisa será a representação pela equação da reta obtida na regressão, da variação da resposta analítica em função do teor do analito.

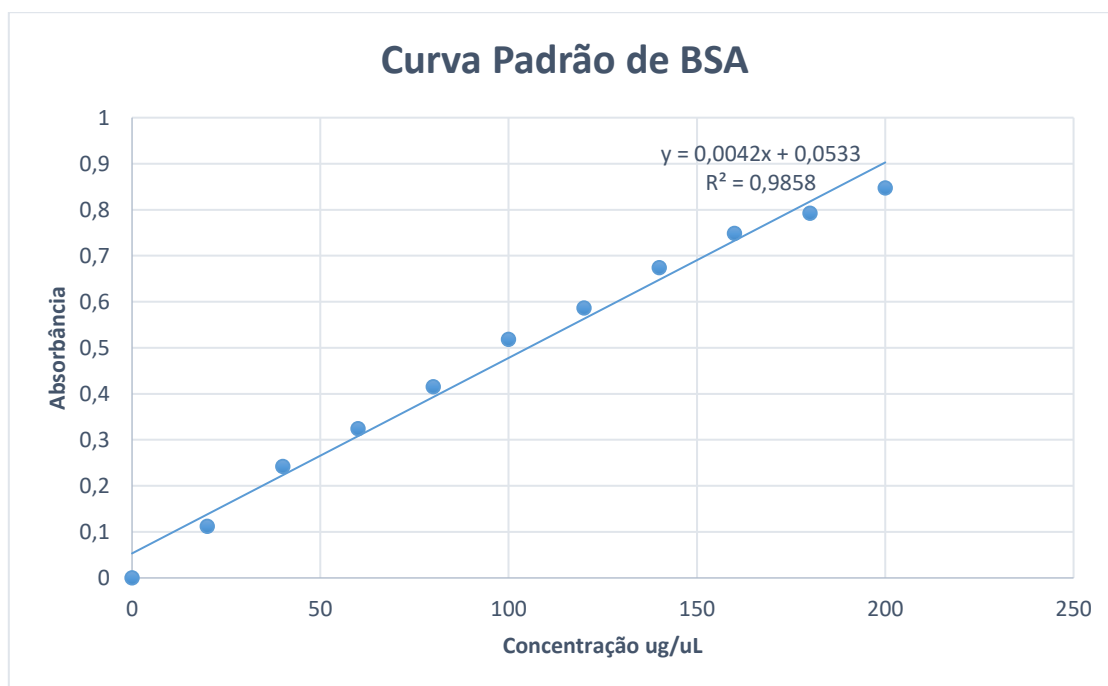


Figura 28. Curva padrão da absorbância x concentração de Albumina Bovina Sérica (BSA) de uma solução de 100ug/uL a 595nm.

APÊNDICE B

Curva Padrão de H₂O₂ para Quantificação de Peróxido de Hidrogênio

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio, uma forma de espécie reativa de oxigênio (ROS), e que pode indicar o nível de estresse sofrido pela

planta, obteve-se dois diferentes gráficos (Figura 13; Figura15). Um gráfico para solução 25 µL/10 mL de com $R^2 = 0,9821$ que foi suficiente para quantificação de H_2O_2 na raiz enquanto o outro gráfico de 50 µL/10 mL com $R^2 = 0,9906$ foi utilizado para quantificação de H_2O_2 na folha por esta apresentar maior quantidade de proteínas.

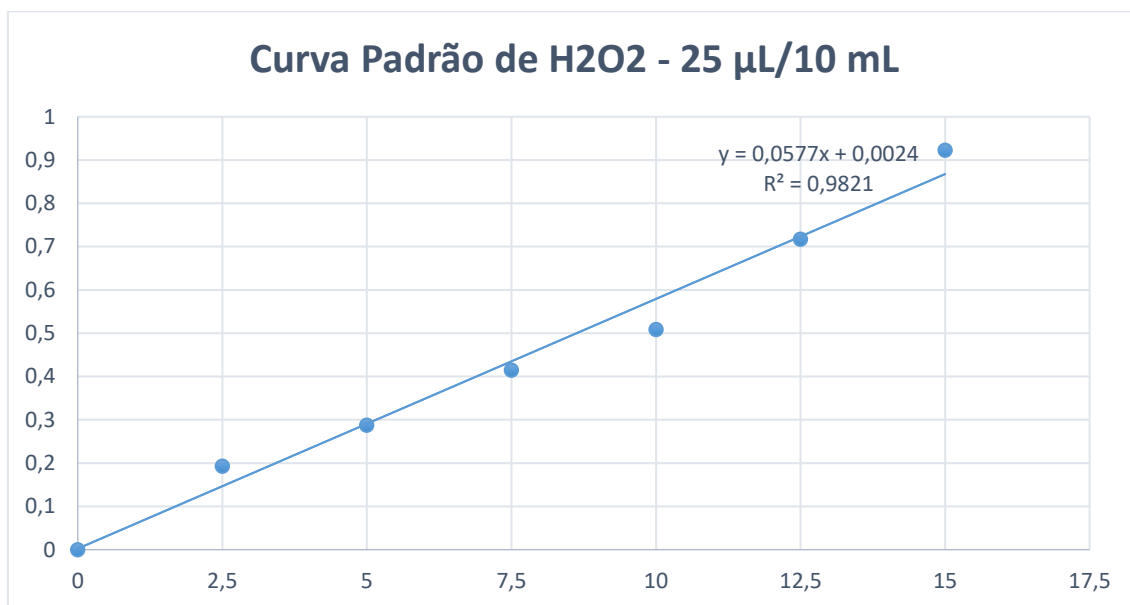


Figura 29. Curva padrão da absorbância x concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) de uma solução de 25µg/10mL.

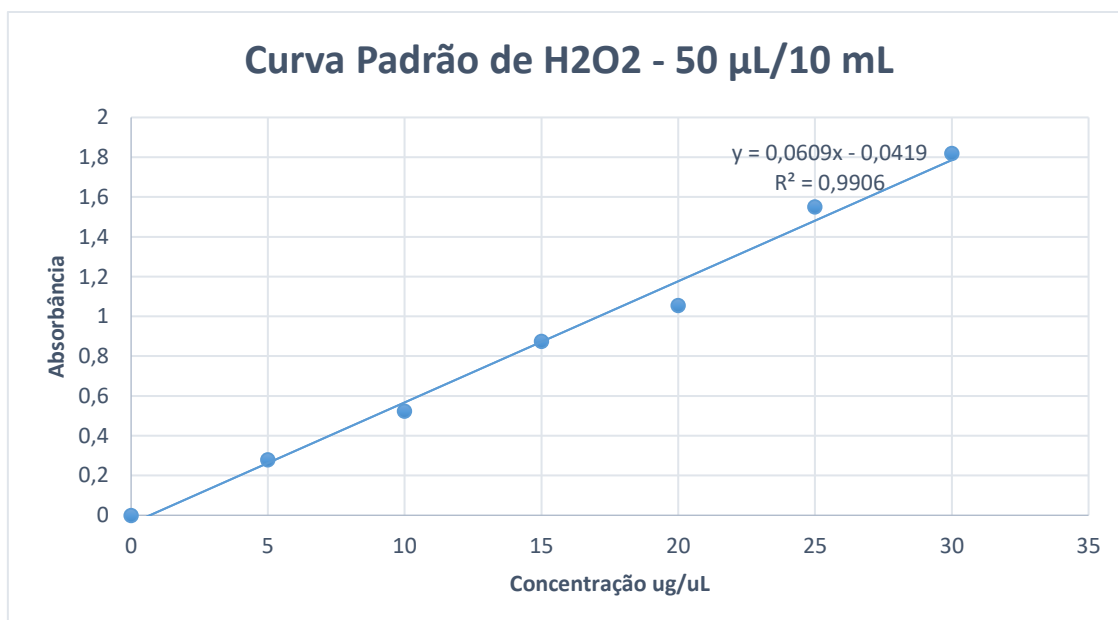


Figura 30. Curva padrão da absorbância x concentração de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) de uma solução de 50µg/10mL.