



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

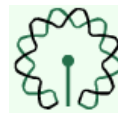
---

JULIANA BABERGE SILVA DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE  
REGULADOR DO CICLO CIRCADIANO *LHY/CCA1-LIKE* EM  
SOJA SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

---

Londrina  
2018



Programa de  
Pós-graduação em  
Genética e Biologia Molecular



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

JULIANA BABERGE SILVA DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE  
REGULADOR DO CICLO CIRCADIANO *LHY/CCA1-LIKE* EM  
SOJA SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

JULIANA BABERGE SILVA DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE  
REGULADOR DO CICLO CIRCADIANO *LHY/CCA1-LIKE* EM  
SOJA SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

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

Orientador: Dr. Alexandre Lima  
Nepomuceno

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

**BABERGE SILVA DE BRITO, JULIANA.**

Caracterização da Expressão do Gene Regulador do Ciclo Circadiano LHY/CCA1-like em Soja sob Condições de Déficit Hídrico / JULIANA BABERGE SILVA DE BRITO. - Londrina, 2018.  
69 f. : il.

Orientador: ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO.

Coorientador: LILIANE MARCIA MERTZ HENNING.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Glycine max - Tese. 2. Seca - Tese. 3. Splicing alternativo - Tese. I. LIMA NEPOMUCENO, ALEXANDRE. II. MERTZ HENNING, LILIANE MARCIA. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

JULIANA BABERGE SILVA DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE REGULADOR DO  
CICLO CIRCADIANO *LHY/CCA1-LIKE* EM SOJA SOB CONDIÇÕES  
DE DÉFICIT HÍDRICO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Liliane Marcia Mertz Henning  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

---

Dra. Larissa Alexandra Cardoso Moraes  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

---

Dr. Eduardo Augusto Ruas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de julho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais João e Jaqueline, aos meus avós Jurandir e Joana, ao meu marido Danilo, ao meu filho Pedro, à minha avó Isahyra (*in memoriam*), à minha família e aos meus amigos. Todos me deram forças e incentivo, sempre me amparando com muito amor e carinho para vencer as batalhas de estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, o autor da vida, por ter me contemplado e amparado com a sua luz divina e sabedoria em todo o decorrer de minha vida;

Agradeço infinitamente ao meu eterno companheiro e amado esposo Danilo, por tanto amor, carinho, paciência, pelo apoio e compreensão, por acreditar em mim me incentivando e proporcionando meus estudos, além da confiança depositada nas minhas escolhas e também por fazer-me mais feliz me ajudando a tornar uma pessoa melhor a cada dia. Sem contar sua imensa ajuda dentro desta pesquisa, sem você meu entendimento seria bem menor, obrigada por ser meu bioinformata;

Agradeço muito pelo presente maravilhoso que recebi este ano, meu filho Pedro que está a caminho, minha riqueza, minha maior felicidade;

Aos meus amados pais, João e Jaqueline que sempre me apoiaram e torceram por minhas vitórias, ao meu pai por abrir os caminhos e tornar minha jornada mais alegre e confiante com muito apoio e dedicação;

Aos meus avós Jurandir e Joana tão queridos e excepcionais, com quem pude contar em todas as etapas da minha vida, minhas eternas bases para viver;

Ao meu irmão Guilherme e toda minha família que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando forças;

Obrigada à Embrapa-Soja pelo espaço cedido e toda a colaboração que permitiu a execução desta pesquisa;

À CAPES/Fundação Araucária pelo apoio financeiro, obrigada;

Muito obrigada meu orientador Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientada, pelos ensinamentos científicos e toda a atenção;

Agradeço imensamente à minha co-orientadora Dra. Liliane Marcia Mertz Henning, por acreditar em mim, por incentivar sempre e pelas oportunidades que me ofereceu;

Aos meus amigos: Martina, Luciano, Rafaela, Jean e Daniele por tanto apoio. Vocês foram fundamentais para minha persistência nesta etapa da vida e também por terem me ensinado tantas técnicas laboratoriais e de viver, principalmente;

A minha imensa gratidão aos amigos, funcionários e estagiários da Embrapa-Soja, em especial ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Bioinformática, onde tive contato durante o período do meu estágio e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização da presente pesquisa;

Ao Programa de Genética e Biologia Molecular pela oportunidade concedida, juntamente agradeço à professora Silvia Helena Sofia pela dedicação e esforço que emprega para ajudar todos os alunos nos motivando dia após dia nessa caminhada;

Agradeço mais que imensamente nossa querida analista da Embrapa Soja, Silvana Regina Rockenbach Marin. Sil, muito obrigada por nos passar tanto conhecimento, por nos salvar de tantos experimentos mal sucedidos, por estar sempre ali nos ajudando. Obrigada de coração por tudo o que fez por mim, sem você essa pesquisa jamais teria saído do papel. Mil vezes, obrigada;

Obrigada Dra. Renata Fuganti Pagliarini pelas grandes contribuições, incentivos e amizade depositados a mim neste percurso, você fez muita diferença;

À Dra. Juliana Marcolino Gomes que foi fundamental para a realização e desenvolvimento deste trabalho;

À banca composta pela Dra. Larissa Alexandra Cardoso Moraes e Dr. Eduardo Augusto Ruas e pelas suas contribuições para esta pesquisa que foram de excelência para a finalização, e;

Agradeço também a todas as pessoas que me ajudaram e me apoiaram de alguma maneira na execução desta dissertação e conclusão do mestrado.

*“Em tudo o que você fizer, seja sempre humilde, guardando zelosamente a pureza de seu coração e a pureza de seu corpo. Se tudo o que somos e temos recebemos de Deus, do que podemos gloriar-nos? É preciso calar e ter silêncio ao seu redor para poder ouvir a voz de Deus.”*

*São Padre Pio de Pietrelcina*

BABERGE SILVA DE BRITO, Juliana. **Caracterização da Expressão do Gene Regulador do Ciclo Circadiano *LHY/CCA1-like* em Soja sob Condições de Déficit Hídrico**. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Os ritmos produzidos pelo relógio circadiano endógeno desempenham um papel crítico ao permitir que as plantas respondam e se adaptem ao meio ambiente. Embora exista uma ligação regulatória bem estabelecida entre o relógio circadiano e as respostas ao estresse abiótico em plantas modelo, ainda há muito a ser estudado sobre o sistema circadiano em espécies cultivadas como a soja. Sabe-se que estresses abióticos como a seca, alteram o padrão de expressão gênica imposto pelo ciclo circadiano para a melhor adaptação fisiológica ao ambiente externo. Em *Arabidopsis*, os genes reguladores do ciclo circadiano, *CCA1* e *LHY*, sob condições de estresse abiótico apresentam *splicing* alternativo com retenção de introns. Neste contexto, este estudo objetivou caracterizar a expressão do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4*, regulador do oscilador central do relógio circadiano na soja, no genótipo de soja suscetível à seca, BR 16 sob condições de déficit hídrico. Assim, a partir de um estudo RNASeq realizado com a cultivar BR 16 sob déficit hídrico, as isoformas expressas do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* foram identificadas *in silico*. Posteriormente, a fim de detectar padrões de retenção de introns desse gene em soja, realizou-se uma PCR convencional a partir de amostras de cDNA e de DNA de quatro diferentes cultivares. Adicionalmente esses *primers* foram também testados em amostras de cDNA de soja sob déficit hídrico, coletadas ao longo do dia. Os produtos de amplificação foram sequenciados para confirmação dos resultados obtidos. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que diferentes padrões de retenção de intron são observados entre soja e *Arabidopsis*, tendo em vista que para o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* não houve retenção de intron, em nenhuma das condições testadas e para nenhuma das cultivares. Apenas um pequeno intron, de aproximadamente 80 pb, apareceu no sequenciamento de DNA de BR 16, o que difere da sequência anotada em banco de dados. A expressão circadiana no gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* em condições de déficit hídrico mostrou picos nos horários iniciais do dia, seguido de uma diminuição nos horários vespertinos e noturnos e novamente um pequeno aumento ao amanhecer. Os níveis de expressão foram maiores na condição controle, o que sugere que o tratamento de seca pode ter sido mais severo. Os dados corroboram a indução de mudanças na expressão do gene *LHY/CCA1-like* em resposta à seca e sua participação como oscilador central do relógio circadiano em *Glycine max*.

**Palavras-chave:** Glycine max. Seca. Splicing alternativo.

BABERGE SILVA DE BRITO, Juliana. **Characterization of *LHY/CCA1-like* Circadian Cycle Regulatory Gene Expression in Soya under Conditions of Water Deficit**. 2018. 70 p. Dissertation (MSc in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The rhythms produced by the endogenous circadian clock play a critical role in allowing plants to respond and adapt to the environment. Although there is a well-established regulatory link between the circadian clock and responses to abiotic stress in model plants, there is still much to be studied about the circadian clock in cultivated species such as soybeans. It is known that abiotic stresses such as drought alter the gene expression pattern imposed by the circadian cycle to best physiologically adapt to the external environment. In *Arabidopsis*, the circadian clock regulator genes, *CCA1* and *LHY*, under abiotic stress conditions present alternative splicing with introns retention. In this context, this study aimed to characterize the expression of the *LHY/CCA1-like/LCL-4* gene, the central oscillator of circadian clock in soybean, in the soybean genotype BR 16, considered drought-susceptible, under of water deficit conditions. Thus, using an RNASeq conducted with BR 16 cultivar under water deficit, the expressed isoforms of the *LHY/CCA1-like/LCL-4* gene were identified in silico. In order to identity patterns of intron retention of this gene in soybean, a standard PCR was performed using cDNA and DNA samples from four different cultivars. In addition, a RT-qPCR was also preformed in soybean cDNA samples under water deficit, collected throughout the day. The amplification products were sequenced to confirm the obtained results. Data showed that there was no intron retention for *LHY/CCA1-like/LCL-4* gene in any of the conditions tested and for none of the cultivars. Only a small intron, of approximately 80 bp, was identified in BR 16 DNA, which differed from the annotated database sequence. Circadian expression in the *LHY/CCA1-like/LCL-4* gene under water deficit conditions showed peaks in the early hours of the day, followed by a decrease in evening times and again a small increase at dawn. Expression levels were higher in the control condition, which suggests that the drought treatment might be more severe than expected. This data corroborate the induction of changes in *LHY/CCA1-like* gene expression in response to drought and its participation as the central oscillator of the circadian clock in *Glycine max*.

**Keywords:** *Glycine max*. Drought. Alternative splicing.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa da Produção Agrícola de Soja no País, indicando os estados produtores. Os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul produzem soja acima de 15.000 mil toneladas por ano. **Fonte:** CONAB, 2018. ....20
- Figura 2** – Crescimento da área cultivada com Soja no Brasil. Os registros se iniciam na safra 03/04 até a safra 17/18, quando o país atingiu 35.046,5 mil hectares semeados com a leguminosa. **Fonte:** CONAB, 2018. ....21
- Figura 3** – Produtividade de Soja no Brasil em kg/ha. Estimativa do rendimento para a safra 2017/18. Histórico registra dados a partir da safra 2003/04. **Fonte:** CONAB, 2018. ....21
- Figura 4** – Modelo Molecular do Oscilador Circadiano de *Arabidopsis*. Os genes são indicados por caixas sólidas. As proteínas são indicadas por formas ovais e oblongas. A transcrição e a tradução são indicadas por linhas tracejadas. A atividade proteica é indicada com linhas contínuas, com linhas que terminam em pontas de flecha indicando ação positiva e linhas que terminam em traços perpendiculares, indicando ação negativa. O núcleo de *loop* de *feedback* *CCA1/LHY/TOC1* é destacado em verde com linhas grossas e formas fechadas. A fosforilação de *LHY* e *CCA1* por *CK2* é indicada com “Ps” em círculos. A área sombreada indica que as atividades atingem um pico a noite, e a área branca indica que as atividades atingem um pico durante o dia. **Fonte:** Figura adaptada (MCCLUNG, 2006). ....30
- Figura 5** – Árvore filogenética agrupando genes do oscilador central do relógio circadiano de *A. thaliana* e *Glycine max* e indicando a semelhança com os dois FTs MYB de *Arabidopsis*, *LHY* e *CCA1*, com o gene denominado *LCL (LHY/CCA1-like gene)* de *G. max*. A previsão da árvore filogenética foi feita usando TreeTop (<http://www.genebee.msu.ru/genebee.html>). **Fonte:** Figura Adaptada (THAKARE; KUMUDINI; DINKINS, 2010). ....33

- Figura 6 -** Sequência do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, disponível na plataforma SoyKB presente nos transcritos de .1 a .6. Os iniciadores (*primers*) para o gene alvo (representados pelas sequências em negrito) foram desenhados flanqueando regiões de exons, utilizando a sequência dos transcritos .1 a .6, disponível na base de dados específica de soja SoyKB, com auxílio do programa *Primer3Plus* (<[www.bioinformatics.nl/primer3plus](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus)>). **Fonte:** SoyKB. ....39
- Figura 7 –** Resultado da amplificação dos iniciadores, na cultivar de soja BR 16, para identificar retenção de introns no gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*. A linha em amarelo está agrupando as bandas com fragmentos de tamanhos aproximados, entre 600 e 300 pb. O marcador *1kb plus* é a base para identificar os tamanhos dos fragmentos. **Fonte:** o próprio autor. ....49
- Figura 8 –** Combinação dos primers em diferentes cultivares. **Fonte:** o próprio autor. ....50
- Figura 9 –** Amplificação com primers LCL4-E2-F / LCL4-E1-R das amostras de cDNA da cultivar BR 16 com os tratamentos controle (C) e déficit hídrico (S) nos seis tempos de (8, 12, 16, 20, 24 e 4h). O marcador *1kb plus* é a base para identificar os tamanhos dos fragmentos. **Fonte:** o próprio autor. ....51
- Figura 10 –** Alinhamento sequência do transcrito .6 do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* predita *in silico* e as sequências de cDNA da cultivar BR 16 com os tratamentos controle e déficit hídrico nos seis tempos de (8, 12, 16, 20, 24 e 4h) em relação a sequência de DNA obtida da cultivar BR 16. **Fonte:** o próprio autor. ....52
- Figura 11 –** Quantificação da expressão do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* sob condições de déficit hídrico e controle ao longo de 24 horas, via RT-qPCR. Os dados foram coletados a cada 04 horas. As amostras foram normalizadas utilizando o gene  $\beta$ -actina (Glyma15G05570). Amplicon obtido de 114 pares de bases. Eficiência de amplificação do gene normalizador de 94%. **Fonte:** o próprio autor. ....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Sequências *Forward* e *Reverse* dos iniciadores utilizados para PCR convencional do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* de soja. A letra “E” significa exon, os números correspondem a qual posição do exon, “F” significa forward e “R” reverse. **Fonte:** o próprio autor. ....39
- Tabela 2** – Resultado do Blast realizado com a sequência do gene *CCA1* (AT2G46830) de *Arabidopsis thaliana* no genoma da soja. **Fonte:** NCBI. ....43
- Tabela 3** – Resultado do Blast realizado com a sequência do gene *LHY* (AT1G01060) de *Arabidopsis thaliana* no genoma da soja. **Fonte:** NCBI. ....44
- Tabela 4** – Transcritos do Glyma.07G048500 presentes e quantidade (x) do transcrito identificados nos tratamentos de déficit hídrico e controle, em soja convencional BR 16, sensível à seca. Dados obtidos a partir de bibliotecas de RNASeq de soja sob déficit hídrico, com coletas a cada 4h em um período de 24hs. Controle (C), Déficit Hídrico (DH). **Fonte:** o próprio autor. ....46
- Tabela 5** – Transcritos do Glyma.07G048500, com detalhes da posição inicial e final e tamanho dos exons presentes em cada transcrito alternativos. Também estão ilustrados os tamanhos putativos dos íntrons considerando as posições no genoma referência de soja, Willians 82. Dados obtidos do Phytozome. **Fonte:** o próprio autor. ....47
- Tabela 6** – Identificação dos amplicons esperados e obtidos e as regiões flaqueadoras dos exons do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*. **Fonte:** o próprio autor. ....49

## LISTA DE SIGLAS

AS	Alternative Splicing – Splicing alternativo
CCA1	Circadian Clock Associated 1
DH	Déficit Hídrico
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico
LCL	LHY1/CCA1-like
LHY	Late Elongated Hypocotyl
IR	Intron Retention – Retenção de Intron
MYB	Myeloblastosis oncogene
RNA	Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico
TOC1	Timing of Cab Expression1
UG	Umidade Gravimétrica
ZT	Zeitgeber Time – Tempo Zeitgeber

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>20</b>
2.1	SOJA: CULTURA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	20
2.2	ESTRESSES ABIÓTICOS – O DÉFICIT HÍDRICO .....	22
2.3	MECANISMOS DE RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO .....	24
2.3.1	Respostas Morfo-Anatômicas e Fisiológicas .....	24
2.3.2	Respostas Moleculares ao Déficit Hídrico .....	27
2.4	O CICLO CIRCADIANO E O DÉFICIT HÍDRICO .....	28
2.5	GENE <i>LHY/CCA1-like</i> ( <i>LCL</i> ) – O OSCILADOR CENTRAL DO RELÓGIO CIRCADIANO EM SOJA .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	36
4.1.1	Busca dos Genes <i>LHY</i> e <i>CCA1</i> em Soja .....	36
4.1.2	Análise <i>In Silico</i> das Variações no Gene <i>GmLHY/CCA1-like/LCL-4</i> em Bibliotecas no RNASeq de Soja sob Déficit Hídrico Amostradas ao longo do Ciclo Circadiano .....	36
4.2	ANÁLISES <i>IN VIVO</i> .....	37
4.2.1	Obtenção do Material Vegetal .....	37
4.2.2	Extração e Purificação de RNA Total .....	38
4.2.3	Síntese de cDNA .....	38
4.2.4	Confirmação da Retenção do Intron via PCR .....	38
4.2.5	Sequenciamento Produto de PCR .....	40
4.2.6	Alinhamento das Sequências Obtidas .....	41
4.2.7	Análise da expressão gênica via RT-qPCR .....	41

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1	BUSCA DA SEQUÊNCIA DO GENE <i>LHY/CCA1-like/LCL-4</i> EM SOJA NO PHYTOZOME .....	42
5.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS VARIAÇÕES NO GENE <i>GmLHY/CCA1-like/LCL-4</i> (GLYMA.07G048500) NAS BIBLIOTECAS DE RNASEQ DE SOJA SOB DÉFICIT HÍDRICO/CICLO CIRCADIANO .....	46
5.3	PCR CONVENCIONAL PARA CONFIRMAÇÃO DA RETENÇÃO DE INTRON .....	48
5.4	PRODUTO DE PCR SEQUENCIADO .....	51
5.5	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE <i>GMLHY/CCA1-like/LCL-4</i> EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO AO LONGO DE 24 HORAS .....	53
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com perspectivas de em breve tornar-se o primeiro. Há três safras consecutivas no país, a soja vem batendo recorde de produção (CONAB, 2018). No entanto, as perdas têm sido recorrentes e expressivas devido, principalmente, ao aumento da frequência de períodos de seca, fato provavelmente associado às mudanças climáticas globais. E este cenário tende a se agravar no futuro com inúmeras previsões científicas que traçam um panorama onde a população mundial terá aumentado significativamente, alcançando, segundo relatório da ONU, 8,5 bilhões de pessoas até 2030, assim como a necessidade de se produzir mais alimentos para atender a esta população crescente (MANAVALAN et al., 2009). Ainda neste contexto desfavorável, a comunidade científica terá de desenvolver estratégias cada vez mais refinadas para lidar com estresses bióticos e abióticos mais severos que interferem diretamente na produtividade média de várias culturas de grãos e afetam negativamente aspectos econômico-financeiros, não somente em nosso país, mas mundialmente. Dentre estes fatores, a seca é o estresse ambiental mais importante (YANG et al., 2010).

Grande parte dos organismos conhecidos sincronizam sua fisiologia e metabolismo temporalmente através de um mecanismo endógeno conhecido como relógio circadiano, responsável por gerar e coordenar oscilações rítmicas num período de aproximadamente 24 horas (MÁS; YANOVSKY, 2009). Sabendo que as plantas são organismos sésseis, estas se adequam melhor às condições ambientais circundantes como a estação, luz e escuridão e as variações de temperatura através do relógio circadiano que coordena e regula seu metabolismo e fisiologia através dos níveis moleculares e celulares, para que estas antecipem as mudanças no meio ambiente adequando-se (JAMES et al., 2012). Porém, os estresses abióticos, como a seca, modificam a sincronia do relógio, alterando o ritmo circadiano e a expressão de genes, em resposta à desidratação e, nas espécies economicamente importantes, como a soja, isso prejudica a produtividade agrônômica (LEGNAIOLI; CUEVAS; MÁS, 2009; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006), uma vez que, a sincronização correta do relógio e do ambiente resulta em crescimento, desenvolvimento e produção otimizados (KHAN; ROWE; HARMON, 2010).

Como o relógio circadiano envolve a expressão de vários genes interligados, as oscilações, tanto bióticas quanto abióticas, interferem na regulação endógena

destes genes, alterando os horários de pico de expressão, podendo também ocorrer ausência de transcritos, exigindo diversos mecanismos reguladores pós-transcrição, incluindo o *splicing* alternativo (AS – *alternative splicing*) (PRUNEDA-PAZ; KAY, 2010; PEREZ-SANTÁNGELO; SCHLAEN; YANOVSKY, 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, mudanças nos padrões de *splicing* alternativos dos genes reguladores do relógio circadiano *CCA1* (*Circadian Clock Associated 1*) e *LHY* (*Late Elongated Hypocotyl*) foram identificados em respostas à calor e frio (FILICHKIN et al., 2010; FILICHKIN; MOCKLER, 2012; JAMES et al., 2012).

Alguns genes ortólogos aos genes do ciclo circadiano de *A. thaliana* foram identificados em soja e parecem apresentar comportamento de expressão semelhante à planta modelo. No entanto, em condições de déficit hídrico, situação em que foram identificados mudanças no padrão de expressão de genes componentes do relógio endógeno e genes responsivos à seca em soja (MARCOLINO-GOMES et al., 2014), indica que estresses abióticos são capazes de alterar a regulação circadiana também em culturas economicamente importantes. Porém, diferentemente de *A. thaliana*, onde há participação dos genes *CCA1* e *LHY1*, apenas um único gene assume as funções de regulador central do ciclo circadiano em soja. O gene oscilador principal nesta leguminosa é o *LHY/CCA1-like* (LIU et al., 2009; THAKARE; KUMUDINI; DINKINS, 2010). De acordo com Liu et al. 2009, o genoma da soja contém quatro fatores de transcrição MYB *LYH1/CCA1-like* genes e não é possível realizar a diferenciação entre os ortólogos putativos *LHY1* e *CCA1*.

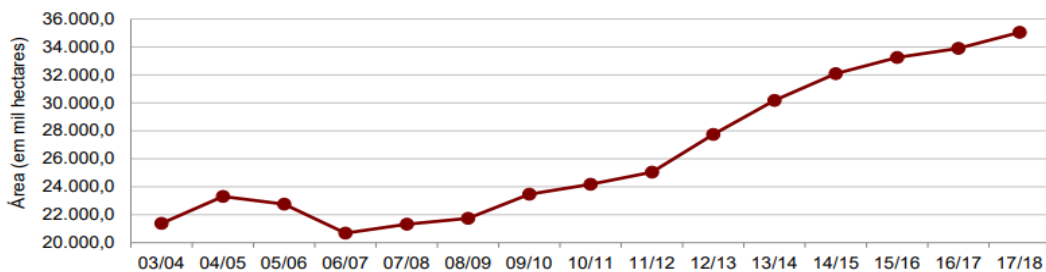
Assim, considerando-se que estresses abióticos, como o déficit hídrico, podem induzir mudanças no padrão de expressão em genes reguladores do ciclo circadiano, o objetivo deste trabalho foi determinar a modulação circadiana do gene *LHY/CCA1-like* (Glyma.07G048500), mais precisamente o *LCL-4*, de soja em resposta ao déficit hídrico.



1940 esta leguminosa passou a ter interesse comercial e, portanto, econômico no Rio Grande do Sul (ALMEIDA et al., 1999), onde seu desenvolvimento se concretizou pelas condições climáticas ideais de cultivo (KULCHESKI, 2013). A partir da década de 1970, o cultivo do grão expandiu-se para outras regiões brasileiras em razão do melhoramento de cultivares adaptadas às diferentes condições climáticas (ALMEIDA et al., 1999).

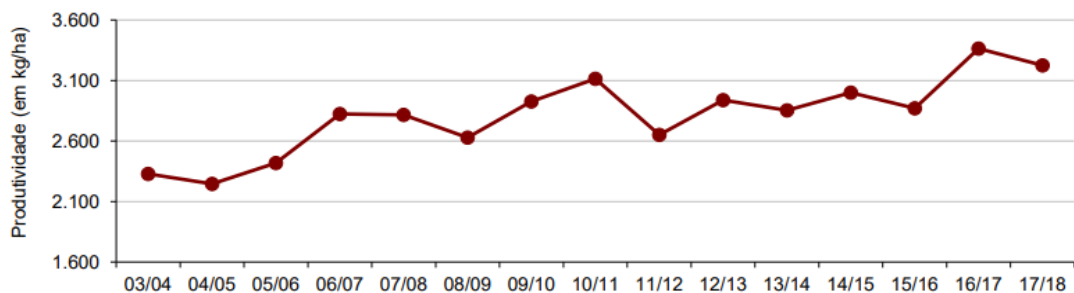
Atualmente, o grão é considerado um dos mais importantes produtos agrícolas da economia brasileira (ROCHA, 2009). Na safra 2017/2018 o território nacional semeado com o grão atingiu 35.046,5 mil hectares (Figura 2). E em razão das boas condições climáticas, o rendimento médio para esta safra foi de 3.225 kg/ha<sup>-1</sup>, atingindo a segunda maior produção registrada no país com cerca de 113 milhões de toneladas. A safra de 2016/2017 foi cerca de 114 milhões de toneladas (Figura 3) (CONAB, 2018).

**Figura 2** – Crescimento da área cultivada com Soja no Brasil. Os registros se iniciam na safra 03/04 até a safra 17/18, quando o país atingiu 35.046,5 mil hectares semeados com a leguminosa.



Fonte: CONAB, 2018.

**Figura 3** – Produtividade de Soja no Brasil em kg/ha. Estimativa do rendimento para a safra 2017/18. Histórico registra dados a partir da safra 2003/04.



Fonte: CONAB, 2018.

Nas áreas da agroindústria, indústria e alimentícia, a soja é um grão versátil que origina diversos produtos e subprodutos. Constitui ainda matéria prima para produtos tais como: ração animal (bovinos, aves, suínos, peixes e animais domésticos, aditivos de alimentos e produtos análogos da carne) onde cerca de 90% da soja consumida é direcionada ao processo de esmagamento, que irá gerar farelo e óleo de soja e, juntamente com o milho, constituirá matéria-prima essencial para a fabricação de rações; bem como formadores de espuma; fabricação de fibras; lecitina, glicerol, esteróis (antioxidantes) e ácidos graxos usados na indústria farmacêutica e cosmética (HIRUKARI; LAZZAROTTO, 2014; APROSOJA, 2017; EMBRAPA, 2017). Além de ser fonte de proteínas, macronutrientes, minerais e outros metabólitos secundários como isoflavonas (SAKAI; KOGISO, 2008) e fitoestrógenos (OSOSKI; KENNELLY, 2003), o grão se constitui ainda uma alternativa para fabricação de biodiesel, sendo responsável hoje por 80% da produção deste combustível no Brasil (ANP, 2017; MAPA, 2017).

Em números, o complexo soja em 2017, liderou a pauta das exportações do país com 41.2% sobre o total exportado, resultando em um ingresso de mais US\$ 16 bilhões (MAPA, 2017). O agronegócio como um todo é responsável por cerca de 20% do PIB do Brasil e embora o país seja também exportador mundial de açúcar, café, suco de laranja e carne de frango, e o segundo maior exportador de carne e milho, a soja é ainda a mais economicamente importante *commodity* agroindustrial produzida e exportada (COLUSSI et al., 2016; VERGARA et al., 2017).

## **2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS – O DÉFICIT HÍDRICO**

A produtividade de diversas culturas economicamente importantes depende das condições ambientais durante o cultivo, muitas vezes comprometidas pelos estresses ambientais causados por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos compreendem o conjunto de seres vivos que atuam na cultura, tanto de forma benéfica quanto de forma maléfica. Os outros fatores não atribuíveis à atividade biológica são definidos como abióticos (EMBRAPA, 2005). Ou seja, os fatores abióticos são os definidos como climáticos, tais como temperaturas extremas, seca, excesso de sais no solo, frio e encharcamento (excesso hídrico). Esses são os estresses abióticos que mais limitam o crescimento e o desenvolvimento das

plantas, reduzindo a produtividade e, em casos extremos, podendo causar a morte das plantas (KRASENSKY; JONAK, 2012).

Apesar dos números de produção positivos e crescentes para a cultura da soja, ainda há perdas na produtividade recorrentes devido ao aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca, e também pela expansão da cultura em áreas que anteriormente não eram cultivadas, sujeitas a maiores problemas decorrentes do clima (JICA, 2017; EMBRAPA, 2017). A insuficiência hídrica é capaz de limitar o crescimento e desenvolvimento da soja afetando sua produtividade e distribuição espacial além da qualidade do grão, principalmente quando a falta de água ocorre nas fases consideradas mais sensíveis à seca, como florescimento e enchimento de grãos (BARBOSA et al., 2013; EMBRAPA, 2005, AGEITEC, 2018). Plantações afetadas por períodos de seca tem sua produtividade drasticamente reduzida (TRAN et al., 2010) principalmente porque, após a germinação, os tecidos das plantas são compostos 90% por água (LICHT; WRIGHT; LENSSEN, 2013).

A seca é um problema global tornando o déficit hídrico (DH) não restrito a apenas algumas áreas produtoras, pois as áreas atingidas estão se expandindo com expectativas futuras de que, nas próximas décadas, ocorram aumentos significativos da temperatura média global, da concentração de gases na atmosfera, principalmente CO<sub>2</sub>, acarretando mudanças climáticas em todo o planeta favorecendo ainda mais o DH (NEPOMUCENO et al., 2001). Em números, o aumento das temperaturas em decorrência do aquecimento global pode provocar perdas nas safras de grãos em torno de R\$ 7,4 bilhões em 2020, número que pode subir para R\$ 14 bilhões em 2070 (ASSAD; PINTO, 2008). De acordo com Pennisi (2008), as estimativas por volta de 2050 mostram que a temperatura global será em média 1,8°C maior que a atual, destacando diversas variáveis relevantes como a diminuição das precipitações pluviométricas afetando cada vez mais a fisiologia das plantas, uma vez que o aumento da temperatura alterará o regime de chuvas, de evaporação da água e da transpiração das plantas.

Estas mudanças meteorológicas atingem diretamente a produtividade das grandes culturas como a soja, reduzindo a produtividade final e provocando prejuízos financeiros. Em vários estados produtores, os números mostram perdas recorrentes em períodos de seca. Na safra 2004/2005, o RS sofreu uma queda de 78% na produção (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2011). Ainda neste estado, a estiagem levou a uma redução média de 22% na produtividade da safra

2007/2008, gerando prejuízos em torno de R\$ 1,6 bilhão (EMBRAPA, 2017). Mais recentemente, na safra 2013/14, as perdas econômicas atingiram um valor próximo a R\$ 9.2 bilhões. O Paraná apresentou reduções recordes nesta safra, resultado de uma lavoura afetada pela ausência de chuvas e por altas temperaturas entre janeiro e fevereiro, fases importantes do desenvolvimento do grão (SEAB, 2016; CONAB, 2017). Ainda na safra 2013/2014, no RS, apesar do incremento na área plantada, a má distribuição das chuvas ao longo do ciclo produtivo prejudicou o desenvolvimento da cultura, provocando uma redução de 4% nos níveis de produtividade. Perdas na Região Sudeste também foram registradas. Em MG, a estiagem associada a altas temperaturas provocaram significativas perdas de produtividade, reduzindo-a em 10,7%. Em SP, mesmo com o grande incremento da área plantada, as adversidades climáticas provocaram forte redução na produtividade (30,2%). Em números, os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de DH nos últimos anos (dados registrados a partir das safras 1976/77 até 2013/2014) alcançam a cifra de US\$ 79,62 bilhões (FERREIRA, 2016).

Várias estratégias podem e devem ser utilizadas para minimizar e reduzir os danos decorrentes de longos períodos de DH. Uma delas é o uso de ferramentas de biotecnologia para melhorar a tolerância ao DH. No entanto, para o desenvolvimento destas plantas, consideradas OGMs ou não-GMs dependendo da modificação genética e da técnica utilizada, é fundamental identificar genes relacionados à característica e entender como esses genes se comportam em resposta ao estresse para o qual se deseja aumentar a tolerância. Assim, estudos básicos que visem esclarecer os mecanismos de resposta ao DH são fundamentais e necessários no delineamento de estratégias para o desenvolvimento de plantas de soja mais tolerantes à seca.

## **2.3 MECANISMOS DE RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO**

### **2.3.1 Respostas Morfo-Anatômicas e Fisiológicas**

A insuficiência hídrica imposta pela condição de seca é o maior fator responsável por afetar o crescimento e a produtividade das plantas na natureza. Como organismos sésseis e incapazes de fugir ou se refugiar de situações adversas

ambientais, os vegetais desenvolveram, pelo processo de evolução, mecanismos de defesa frente a estas situações de estresse. Estas respostas incluem inúmeras modificações morfológicas, fisiológicas e metabólicas em todos os órgãos vegetais (KLAMKOWSKI; TREDER, 2006), tais como: fechamento estomático, repressão do crescimento celular e da fotossíntese, aumento da respiração, interferência nos ritmos circadianos, além de alterações moleculares na regulação/expressão de genes, como aumento de mRNA sem sentido gerado por *splicing* alternativo (AS), retenção de intron (IR) com diferenças ou silenciamento no produto final ou degradação por *nonsense-mediated decay* (NMD), tais fatores influenciam na regulação da planta a fim de proporcionar sua sobrevivência e controlar a morte celular programada (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; FILICHKIN et al., 2015) entre outras.

As respostas fisiológicas ou adaptações vegetais dependem do tempo de duração da desidratação e da intensidade. O efeito da deficiência hídrica na produção depende ainda da época de ocorrência, de sua severidade, do genótipo da planta e do estágio de desenvolvimento vegetal (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; BERLATO, 1981; FAGERIA, 1989).

De acordo com Turner; Wright e Siddique (2001), as plantas utilizam estratégias em condições de DH que podem ser classificadas em quatro grupos distintos de mecanismos: evitamento, tolerância, escape e recuperação à seca. Os dois principais mecanismos de defesa vegetal são evitamento e tolerância (FANG; XIONG, 2015). A estratégia de manter níveis de água nos tecidos vegetais durante períodos de estresse é o evitamento à seca, que pode ocorrer tanto pela absorção de água pelas raízes, quanto pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. Já na condição de tolerância à seca, a planta mantém seu turgor e continua seu metabolismo mesmo em condições de baixo potencial hídrico. Tal estratégia se dá através da síntese de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997). O mecanismo de escape à seca confere à planta capacidade natural ou induzida de ajustar o crescimento e desenvolvimento, desde que a estação ou os períodos de seca prolongada sejam evitados, resultado do crescimento acelerado e florescimento precoce, podendo muitas vezes acarretar diminuição do número de sementes (FANG; XIONG, 2015; WITCOMBE et al., 2008). Desta forma, as plantas evitam a seca aumentando o teor relativo de água, utilizando menos água disponível, mantendo uma baixa condutância na epiderme e

ainda diminuindo as trocas gasosas (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997). Portanto, a capacidade da planta de retomar rapidamente seu crescimento e enchimento de grãos após a exposição a períodos severos de DH refere-se à recuperação à seca, isto quando nestes períodos ocorrem a completa paralisação do crescimento, perda do turgor celular e desidratação foliar (LUO, 2010).

Segundo Sirichandra et al. (2009), uma das respostas iniciais contra o DH é a diminuição da condutância estomática, pois esta reduz a evaporação através das folhas, diminui a perda de água e limita a difusão de CO<sub>2</sub> para os cloroplastos. A resposta de fechamento estomático ocorre por consequência do aumento das concentrações do hormônio ácido abscísico (ABA) (LIMA et al., 2002). O ABA é ainda responsável por inúmeros outros mecanismos adaptativos ao estresse, tais como a ativação de genes ligados ao ajustamento osmótico, compartimentalização iônica, crescimento e modulação das raízes e sua condutividade hidráulica, limitação da taxa de transpiração, controle da desidratação e diminuição do crescimento foliar (HSIAO, 1973; SALISBURY; ROSS, 2013).

Outro importante mecanismo fisiológico em resposta à falta de água é o ajuste osmótico. Este mecanismo adaptativo, concretizado na síntese de moléculas osmoprotetoras como açúcares (trealose, sacarose, frutose), aminoácidos (prolina e triptofano) e compostos de amônio (poliaminas e glicil-betaína), reduz o potencial osmótico, aumentando a retenção de água na célula e retardando a senescência e a morte (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001), em condições de DH.

Dentre os mecanismos morfológicos de adaptação estão o desenvolvimento de tricomas e pêlos radiculares, redução da área foliar e queda das folhas induzida em grande parte pela síntese de etileno, que permite diminuir a transpiração, além da alteração da orientação das folhas (ISODA; WANG, 2002), diminuindo o ângulo de incidência dos raios solares (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em condições de escassez de água, o sistema radicular também exerce um importante papel, pois as plantas constantemente obtêm água e nutrientes através das raízes. O comprimento, peso, volume e densidade das raízes também estão relacionados à tolerância à seca em diversas culturas (PRICE et al., 2002). Algumas plantas, por exemplo, no início do período de DH, são capazes de acentuar o crescimento das raízes para que elas possam explorar maiores profundidades de solo, absorvendo maior quantidade de água (HU; XIONG, 2014).

### 2.3.2 Respostas Moleculares ao Déficit Hídrico

A percepção dos sinais de estresses ambientais é um passo importante na determinação da sobrevivência e na reprodução de plantas expostas a diferentes condições.

Os modelos de percepção estabelecidos para os vegetais superiores sugerem várias hipóteses para o início da sinalização em nível molecular. As alterações na conformação de membranas celulares é a percepção mais aceita, pois, devido à perda de turgidez, diversas modificações mecânicas ocorrem na planta, como mudanças em canais de transporte ativados por pressão, remodelagens na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais críticas imersas nas membranas celulares e/ou também alterações na continuidade entre a parede e a membrana celular. Tais alterações iniciam uma cascata de eventos moleculares em resposta à perda de água, ativada por complexos enzimáticos que induzem a expressão de diversas categorias gênicas (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007; NEPOMUCENO et al., 2001; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002).

A pesquisa tem direcionado esforços nas últimas décadas para compreender esta complexa rede de resposta, iniciada com a percepção do estresse ambiental. Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007) dividiram em dois grandes grupos os produtos dos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, como o DH. No primeiro grupo, são encontrados genes funcionais, já o segundo grupo é composto por genes reguladores. Os genes funcionais codificam diversas proteínas como chaperonas, LEA, anticongelantes, de ligação ao mRNA, bem como diferentes enzimas que são chaves na biossíntese de osmólitos e de desintoxicação entre várias proteases. Os genes reguladores, no entanto, regulam a expressão de genes e transdução de sinais em resposta ao estresse, também codificam a biossíntese do ABA, além dos genes que codificam para fatores de transcrição como *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding* – Elemento de ligação de resposta a desidratação), *AREB* (*ABA Responsive Element Binding* - Elemento de ligação de resposta ao ABA), *MYC* (*Myelocytomatosis oncogene*), *MYB* (*Myeloblastosis oncogene*), *NAC* (*NAM, ATAF 1,2 e CUC*), *HB* entre outros (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Conhecer e compreender como estes genes atuam, ativando ou reprimindo mecanismos em resposta a estresses abióticos pode auxiliar os pesquisadores na escolha de genes para as estratégias de desenvolvimento de plantas mais tolerantes. Dentre os fatores de transcrição (FTs), de ambas as vias de resposta à seca, ABA dependente e independente, plantas transformadas com *DREB* e *AREB* mostraram aumento na tolerância ao DH (LIU et al., 1998; JAGLO-OTTONSEN et al., 1998; GILMOUR et al., 1998; KASUGA et al., 2004; DUBOUZET et al., 2003; ITO et al., 2006; QIN et al., 2007; PELLEGRINESCHI et al., 2004; GAO et al., 2009; BHATNAGAR-MATHUR; VADEZ; SHARMA, 2008; DEVI et al., 2011; VADEZ et al., 2013; POLIZEL et al., 2011; ROLLA et al., 2014; SAKUMA et al., 2006a, 2006b; QIN et al., 2007; CHEN et al., 2007). Não apenas FTs, mas também plantas contendo genes de vias metabólicas importantes envolvidas com mecanismos ativados em resposta ao DH, tais como *NCED* (*9-cis-epóxicarotenóide dioxigenase*) enzima chave na síntese de ABA (BURBIDGE et al., 1999; QIN; ZEEVAART, 1999; IUCHI et al., 2000; CHERNYS; ZEEVAART 2000; WAN; LI, 2005; RODRIGO; ALQUÉZAR; ZACARÍAS, 2006) hormônio fundamental na resposta à seca, e genes responsáveis pela de síntese de osmoprotetores envolvidos no ajuste osmótico, tais como *Gols* (galactinol sintase) responsável pela síntese do galactinol da família de oligossacarídeos de rafinose (*Raffinose family oligosaccharides* – RFOs) (SANTOS et al., 2011; SENGUPTA et al., 2012; STOLF-MOREIRA et al., 2010; VOLK; HARITATOS; TURGEON, 2003; ZHAO et al., 2004), apresentaram maior tolerância em condições de deficiência hídrica. Em soja, plantas transformadas com genes *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtAREB*, *AtNCED* e *AtGols* foram experimentadas em casa de vegetação e campo sob DH e, nestas condições ativaram mecanismos de respostas à seca indicando maior tolerância sem comprometimento da produtividade (POLIZEL et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; ROLLA et al., 2013; ENGELS et al., 2013; HONNA et al., 2016; MARINHO et al., 2016; FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017).

#### **2.4 O CICLO CIRCADIANO E O DÉFICIT HÍDRICO**

As plantas estão sujeitas às oscilações diurnas devido ao movimento do planeta em torno de seu eixo, gerando luz e temperaturas variadas. Além das

variações dia/noite/estações do ano, as plantas também estão sujeitas a outras variações ambientais sejam elas bióticas e abióticas. Para se adaptar a estas mudanças e se desenvolver dentro da melhor condição ambiental, otimizando seu crescimento e desenvolvimento, as plantas utilizam um relógio circadiano endógeno, que regula/dirige os processos vitais para partes específicas do dia/estação (LEGNAIOLI; CUEVAS; MÁZ, 2009).

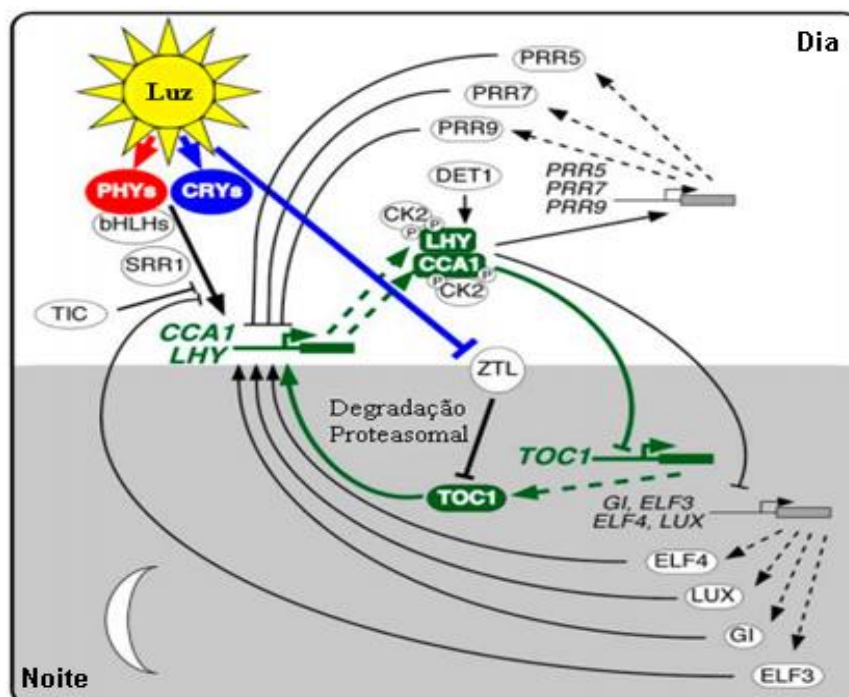
Os ritmos circadianos aumentam a eficiência de processos fisiológicos sincronizando o *timing* desses processos com ótimas condições ambientais. A adequação e a adaptação vegetal são marcadamente aumentadas quando o ciclo circadiano interno coincide com ciclos ambientais. Segundo Legnaioli; Cuevas e Más (2009), os “relógios” circadianos conferem vantagens adaptativas aos organismos não apenas por meramente responder a sinais externos, mas também por antecipar mudanças previsíveis de variação ambiental que ocorrem durante a transição dia-noite. Assim, a presença de um sistema de *timing* endógeno permite que as atividades biológicas ocorram, sincronicamente, em uma fase específica relacionada ao ambiente, possibilitando a separação temporal de eventos metabólicos não compatíveis com as condições externas.

Existem diversas evidências que mostram que os ritmos circadianos controlam inúmeros processos na maioria dos seres vivos, incluindo as plantas superiores (HARMER et al., 2000). Por exemplo, processos como a transcrição gênica, atividades de algumas enzimas (JOHNSON et al., 1995; HOTTA et al., 2007), abertura e fechamento dos estômatos, assimilação de CO<sup>2</sup> e movimentos foliares, tais fatores estão associados a mecanismos endógenos controlados por um relógio biológico (WEBB, 1998; DOWSON-DAY; MILLAR, 1999). Alguns autores sugerem ainda que os relógios circadianos afetam positivamente o teor de clorofila, a fotossíntese e eficiência no uso da água, e genes de florescimento da planta (GORTON; WILLIAMS; ASSMAN, 1993; DODD et al., 2005; THAKARE; KUMUDINI; DINKINS, 2010).

Na grande maioria dos organismos, os relógios circadianos atuam predominantemente através de rotação de *feedback* regulatórios transcricionais interligados (PRUNEDA-PAZ; KAY, 2010). Em *A. thaliana*, diversos genes reguladores do ciclo circadiano foram identificados, sendo os principais: *TOC1* (*Timing of CAB expression 1*) (STRAYER et al., 2000), *CCA1* (*Circadian Clock Associated-1*) (WANG; TOBIN, 1998), *GI* (*Gigantea*), *LHY* (*Late Elongated*

*Hypocotys*) (SCHAFFER et al., 1998) e *ELF3* (*Early Flowering 3*) (ZAGOTTA et al., 1996). Nesta planta modelo, o controle e a manutenção do ciclo circadiano ocorre por meio de mecanismos acurados de balanço e *feedback* que incluem os FTs MYB expressos pela manhã, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) (WANG; TOBIN, 1998) e *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*) (SCHAFFER et al., 1998) (Figura 04). Estes regulam negativamente a expressão do regulador de pseudo-resposta *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*, também conhecido como *PRR1*) (STRAYER, 2000; MATSUSHIKA et al., 2000). *TOC1*, por sua vez, impulsiona positivamente a transcrição de *CCA1* e *LHY*, fechando o *loop* para o próximo ciclo (ALABADÍ et al., 2001). Contudo, a expressão de *CCA1* e *LHY* é, por sua vez, rigorosamente regulada por outros componentes do relógio, incluindo os membros da família *TOC1*, *PRR7* e *PRR9*, que formam o chamado ciclo da manhã (FARRÉ et al., 2005; NAKAMICHI et al., 2005; SALOMÉ; MCCLUNG, 2005).

**Figura 4** – Modelo Molecular do Oscilador Circadiano de *Arabidopsis*. Os genes são indicados por caixas sólidas. As proteínas são indicadas por formas ovais e oblongas. A transcrição e a tradução são indicadas por linhas tracejadas. A atividade proteica é indicada com linhas contínuas, com linhas que terminam em pontas de flecha indicando ação positiva e linhas que terminam em traços perpendiculares, indicando ação negativa. O núcleo de *loop* de *feedback* *CCA1/LHY/TOC1* é destacado em verde com linhas grossas e formas fechadas. A fosforilação de *LHY* e *CCA1* por *CK2* é indicada com “Ps” em círculos. A área sombreada indica que as atividades atingem um pico a noite, e a área branca indica que as atividades atingem um pico durante o dia.



Fonte: Figura adaptada (MCCLUNG, 2006).

As oscilações de altas e baixas frequências são mecanismos marcadores de tempo ou doadores de tempo denominados como "Zeitgeber" (ZT – Tempo Zeitgeber), que servem para definir e integrar os eventos e separar os períodos diurnos dos períodos noturnos (ASCHOFF, 1978).

Existe uma sobreposição significativa entre os genes regulados pelo relógio e os genes afetados por diferentes estresses abióticos (COVINGTON; HARMER, 2007; MATSUI et al., 2008; MIZUNO; YAMASHINO, 2008). Uma das primeiras evidências das modificações no ciclo circadiano induzida por DH foi obtida em 2009, por Legnaioli; Cuevas e Más. Estes pesquisadores desenvolveram um trabalho com mutantes para o gene *TOC1* em *Arabidopsis* e realizaram análises do transcriptoma por meio de microarranjos e de PCR quantitativo. Os dados obtidos mostraram evidências de um mecanismo de *feedback* que interconecta o “relógio” circadiano e as respostas das plantas ao DH, mediadas por ABA. Um componente-chave do ciclo circadiano *TOC1* se liga ao promotor de genes ABA-responsivos (*ABAR/CHLH/GUN5*) controlando sua expressão circadiana. Estudos genéticos com plantas superexpressando *ABAR* e *TOC1* e também plantas RNAi para estes genes demonstraram respostas defectivas à seca, suportando a hipótese de que a função de ABA “relógio” – dependente é importante para a homeostase celular em ambientes secos (ALABADÍ et al., 2001). Além da deficiência hídrica, existem ainda relatos que mostram conexões entre as respostas de plantas de *A. thaliana* a outros estresses, tais como calor e frio e as oscilações diurnas ou ao relógio circadiano (BIENIAWSKA et al., 2008; FOWLER; COOK; THOMASHOW, 2005).

Cabe ressaltar que estresses abióticos podem modificar a expressão de genes, não apenas de genes de manutenção e genes estresse-induzidos, mas também de genes responsáveis por este relógio biológico com fino ajuste que rege os ciclos circadianos vegetais. Assim, condições adversas ambientais atuam aumentando, diminuindo ou até induzindo a expressão de diferentes isoformas pelo mecanismo de *splicing* alternativo. Na planta modelo, *A. thaliana*, padrões de *splicing* alternativos dos pré-mRNAs dos genes regulatórios *LHY* e *CCA1* mostraram alterações em respostas ao calor e frio (FILICHKIN et al., 2010; FILICHKIN; MOCKLER, 2012; JAMES et al., 2012). Em *Populus trichocarpa*, o tratamento de seca por duas semanas, induziu o acúmulo significativo de uma isoforma com retenção de um intron longo do gene *CCA1/LHY* em raízes (FILICHKIN et al., 2015).

Em soja, Marcolino-Gomes et al. (2014) mostraram que genes do ciclo circadiano e genes seca-responsivos apresentaram mudanças marcantes na expressão gênica, sob condições de DH. Dentre os genes componentes do relógio endógeno, tais como *LCL1*, *GmELF4* e *PRR-like*, houve uma redução na expressão gênica, em plantas estressadas. As mesmas condições produziram um avanço de fase de expressão para os genes *GmTOC1-like*, *GmLUX-like* e *GmPRR7-like*. Da mesma forma, o padrão de expressão rítmica dos genes sensíveis à seca da soja tais como *DREB-*, *bZIP-*, *GOLS-*, *RAB18-* e *Remorin-like* mudou significativamente após a exposição da planta à seca.

Embora exista alguma informação sobre o ciclo circadiano e suas modificações em condições de deficiência hídrica em *A. thaliana*, estudos mais detalhados e profundos em culturas economicamente importantes, como a soja, são escassos e muito ainda falta para a total compreensão de como o ciclo circadiano regula a expressão de genes visando ajustar e aumentar o *fitness* vegetal às condições ambientais adversas como a seca, portanto, pesquisas que visem elucidar esses mecanismos devem ser realizadas e as informações utilizadas no desenvolvimentos de plantas mais tolerantes.

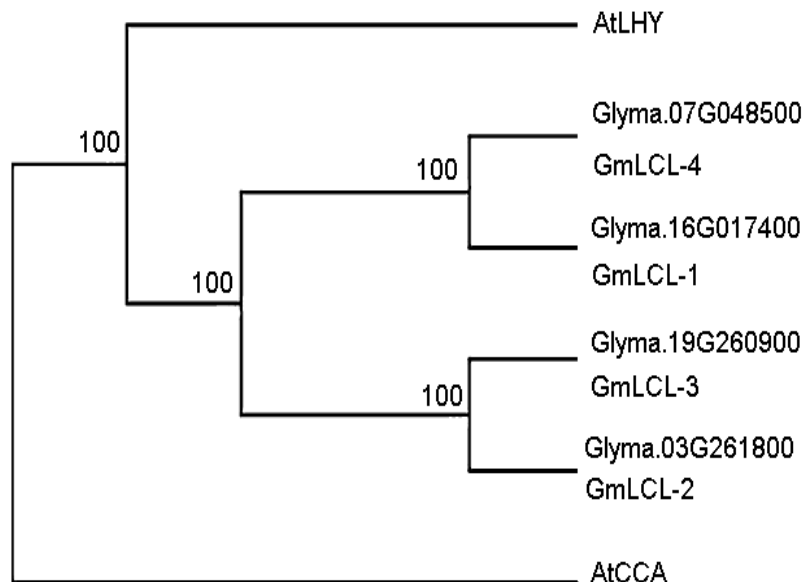
## **2.5 GENE LHY/CCA1-like (LCL) – O OSCILADOR CENTRAL DO RELÓGIO CIRCADIANO EM SOJA**

O oscilador central do relógio circadiano de *Arabidopsis* é composto por vários laços de *feedback* interligados que interagem na expressão de dois fatores de transcrição MYB parcialmente redundantes, *Late Elongated Hypocotyl (LHY)* e *Circadian Clock Associated 1 (CCA1)* (GARDNER et al., 2006; HARMER, 2009). Essas proteínas coassociadas são conhecidas por regular negativamente sua própria síntese, inibindo a expressão do *Timing of Cab Expression 1 (TOC1)*, um ativador *LHY/CCA1* (ALABADÍ et al., 2001).

Em soja, no entanto, o oscilador central do relógio circadiano parece ser responsabilidade de apenas um gene, o *LCL (LHY/CCA1-like)* homólogo ao *core LHY/CCA1* de *Arabidopsis*. No genoma deste importante grão, foram identificados alguns ortólogos para os genes do relógio circadiano de *Arabidopsis* que mostraram oscilação semelhante à de *Arabidopsis* em situações controladas (LIU

et al., 2009; SULLIVAN; JENKINS; NIMMO, 2004; HUDSON, 2010; THAKARE; KUMUDINI; DINKINS, 2010). Com relação ao *core LHY/CCA1*, o genoma de soja apresenta quatro FTs MYB *LHY1/CCA1-like* genes, ou *LCL1-4* de acordo com a terminologia de Liu et al. (2009). Uma árvore filogenética (Figura 5) realizada por Thakare; Kumudini e Dinkins (2010) formou dois grupos: um contendo o Glyma.07G048500 e Glyma.16G017400, e outro o Glyma.03G261800 e Glyma.19G260900, porém não foi possível diferenciar os ortólogos putativos de *LHY1* e *CCA1*. Para ser congruente com Liu et al. (2009), Thakare; Kumudini e Dinkins (2010) rotulou tais nomenclaturas como: Glyma.16G017400 *LCL-1*, Glyma.03G261800 *LCL-2*, Glyma.19G260900 *LCL-3* e Glyma.07G048500 *LCL-4*. Anteriormente, Marcolino-Gomes et al. (2014), verificou que o gene *LCL-4* (sendo chamado de *LCL-1* em tal pesquisa, porém o correto é *LCL-4*) mostrou resposta à seca, por isto este é o foco deste estudo.

**Figura 5** – Árvore filogenética agrupando genes do oscilador central do relógio circadiano de *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max* e indicando a semelhança com os dois FTs MYB de *Arabidopsis*, *LHY* e *CCA1*, com o gene denominado *LCL* (*LHY/CCA1-like gene*) de *G. max*. A previsão da árvore filogenética foi feita usando TreeTop (<http://www.genebee.msu.ru/genebee.html>).



Fonte: Figura Adaptada (THAKARE; KUMUDINI; DINKINS, 2010).

Cabe ressaltar que os quatro ortólogos de soja, *LCL-1*, *LCL-2*, *LCL-3* e *LCL-4* possuem aproximadamente 48% de similaridade com os genes *CCA1* e *LHY* de

*Arabidopsis*, inclusive os aminoácidos são compartilhados aleatoriamente entre todos os ortólogos de soja. No entanto, os domínios MYB nos produtos dos genes em soja *CCA1/LHY-like* genes são altamente conservados (maior que 90%) em comparação com os genes *Arabidopsis CCA1* e *LHY*. Embora os ortólogos em soja sejam semelhantes, eles ainda são distinguíveis por suas diferenças de sequências e estas podem acarretar em diferentes funções e ajustes no relógio circadiano, atuam assim também de forma diferente na regulação gênica, ativando/reprimindo ou induzindo diversas isoformas pelo mecanismo de *splicing* alternativo, seja em boas condições ambientais ou em situações de estresses ambientais como a seca (NAEEM et al., 2015, FILICHKIN et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a modulação circadiana do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500), de soja em resposta ao déficit hídrico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Correlacionar o mecanismo de regulação circadiana envolvido na resposta ao tratamento de déficit hídrico em *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max*;
- ✓ Identificar *in silico* variações circadianas no gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500), na cultivar BR 16 sob tratamento de déficit hídrico;
- ✓ Validar *in vivo* variações na sequência do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500), ao longo do ciclo circadiano na cultivar BR 16 sob tratamento de déficit hídrico e;
- ✓ Identificar variações de expressão no gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500), ao longo do ciclo circadiano na cultivar BR 16 sob tratamento de déficit hídrico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANÁLISES *IN SILICO*

#### 4.1.1 Busca dos Genes *LHY* e *CCA1* em Soja

Para identificar o gene do oscilador central do relógio circadiano em soja (*Glycine max*), inicialmente foi feita a busca pelas sequências dos genes *LHY* (AT1G01060) e *CCA1* (AT2G46830) de *A. thaliana* no banco de dados TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). A seguir as sequências FASTA foram obtidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e um Blast foi realizado no genoma referência da soja Willians 82, na plataforma Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

#### 4.1.2 Análise *In Silico* das Variações no Gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* em Bibliotecas no RNASeq de Soja sob Déficit Hídrico Amostradas ao longo do Ciclo Circadiano

Para análise *in silico*, foram utilizados dados de bibliotecas de RNAseq de soja previamente obtidas pela equipe de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, conforme descrito por Rodrigues et al. (2015). O banco de dados foi constituído por 36 bibliotecas de RNAseq realizadas com folhas de soja da cultivar BR 16, submetidas ao tratamento de déficit hídrico e condição controle, e coletadas a cada 4hs em um período de 24 hrs, foram obtidas as sequências brutas (*raw data*). Assim os dados foram amostrados nos tempos 4h, 8h, 12h, 16h, 20h e 24h. Essas bibliotecas foram sequenciadas *single-end* em plataforma Hi-Seq 2000, em três repetições biológicas (Illumina), com fragmentos de 50 pares de bases.

Depois de concatenadas as repetições biológicas, foi realizada a verificação da qualidade das sequências com o software FastQC v.0.11.5 (ANDREWS, 2010). Em seguida foi realizada a trimagem (limpeza) com o software Trimmomatic v.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para remoção dos adaptadores, sendo selecionados para as próximas análises, apenas fragmentos com *Phred score* acima de  $\geq 20$ , e de tamanho entre 36 e 45 pares de bases (1 cultivar X 6 tempos

amostrados X 3 repetições biológicas X 2 tratamentos – controle e déficit hídrico = 36).

Utilizando o programa HISAT2 v.2.1.0 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015) foi realizado o alinhamento das sequências no genoma referência de soja Willians 82, disponível no Phytozome, versão Gmax.W82.a2.v1. Alinhamentos múltiplos e fragmentos que não alinharam foram removidos das análises subsequentes.

A seguir, utilizando o software SAMtools v.1.5 (LI et al., 2009), foram removidas as artefatos de PCR (duplicatas não-naturais). Finalmente, foi realizado o mapeamento dos *reads* utilizando o *software* StringTie v.1.3.3 (PERTEA et al., 2015). Este software utiliza um arquivo gff3, contendo a anotação de todos os genes do genoma de *G. max*, assim para “resgatar” o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* de soja em todas as bibliotecas foi utilizado o Glyma correspondente. Para identificar o principal transcrito do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* em BR 16 foram utilizadas as informações de posição inicial e final dos exons no genoma.

Também foi realizada a análise de expressão diferencial utilizando o software GFOLD versão 1.1.4 (FENG et al., 2012) visando identificar possíveis diferenças no nível de expressão em resposta à imposição do déficit hídrico e do ciclo circadiano.

## **4.2 ANÁLISES *IN VIVO***

### **4.2.1 Obtenção do Material Vegetal**

O experimento foi conduzido com plantas da cultivar BR16 que apresenta maior sensibilidade à seca (OYA et al., 2004). As sementes foram previamente cultivadas em vasos de turfa (*Jiffy*) com substrato Supersoil® (*Scotts Miracle-Gro Company, Marysville, Ohio, EUA*). As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento com ciclos de luz/escuro de 14h/10h, com 500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de luz branca (fornecidos por lâmpadas fluorescentes brancas frias), e ciclos de temperatura de 28°C/20°C durante os períodos de luz e escuro, respectivamente. Quinze dias após a germinação, quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V<sub>2</sub> (FEHR et al., 1971), a irrigação foi suspensa para induzir um déficit moderado de água, correspondendo a três dias de retenção de água. Na condição controle, a umidade foi mantida próxima à capacidade de campo, ajustando o volume de irrigação para

70% de umidade gravimétrica (UG) e na condição de tratamento de déficit hídrico moderado foi mantida a 30% de UG.

O experimento foi conduzido com triplicata biológica e as coletas realizadas ao longo de um ciclo de 24 horas, iniciando às 8h (ZT0) e com intervalos de quatro horas entre cada coleta (12h/ZT4, 16h/ZT8, 20h/ZT12, 24h/ZT16 e 4h/ZT20). As amostras referentes ao período de escuro foram coletadas com a ajuda de uma pequena luz LED verde (PhotonLight.com). Coletou-se o primeiro trifólio de cada planta, os quais foram imediatamente congelados em Nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA total (MARCOLINO-GOMES et al., 2014).

#### **4.2.2 Extração e Purificação de RNA Total**

O RNA total foi isolado utilizando o *TRIzol® Reagent* da *Invitrogen™* (*Thermo Fisher Scientific*). O DNA genômico contaminante no RNA total foi removido através de tratamento com DNase I (*Turbo DNA-free - Ambion by Life Technologies, Grand Island, NY, EUA*) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade das moléculas de RNA foi analisada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

#### **4.2.3 Síntese de cDNA**

O RNA total obtido foi utilizado para síntese de cDNA com o kit *Superscript III First Strand Synthesis* (*Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA*) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi utilizado nas análises de PCR convencional, sequenciamento e RTqPCR do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500).

#### **4.2.4 Confirmação da retenção do intron via PCR**

Para verificar a ocorrência de eventos de *splicing* e/ou retenção de íntrons no gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* foi realizada análise de PCR convencional nos

cDNAs obtidos. Os iniciadores (*primers*) para o gene alvo foram desenhados flanqueando regiões de exons, utilizando a sequência dos transcritos .1 a .6, conforme informação disponível na base de dados específica de soja SoyKB, com auxílio do programa *Primer3Plus* (<[www.bioinformatics.nl/primer3plus](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus)>). As informações referentes aos *primers* utilizados são apresentadas na Tabela 1 e Figura 6.

**Tabela 1** – Sequências *Forward* e *Reverse* dos iniciadores utilizados para PCR convencional do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, de soja. A letra “E” significa exon, os números correspondem a qual posição do exon, “F” significa *forward* e “R” *reverse*.

Primer	Sequência 5' – 3'
LCL4-E2-F	CCTCTTCATACTTCTTTTGC
LCL4-E3-F	TACTTCATCAAAGGCTACTG
LCL4-E4-F	AAACAAAGGGCAGAAAAC
LCL4-E5-F	ACTAGAGAAGGGTGAGAAAG
LCL4-E1-R	GATCTTCGTCTTTGTCTATCT
LCL4-E3-R	GTTGAGCTTCCGAGTATT
LCL4-E5-R	TAATTGGTTAGCATCAGGT

Fonte: o próprio autor.

**Figura 6** – Sequência do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, disponível na plataforma SoyKB presente nos transcritos de .1 a .6. Os iniciadores (*primers*) para o gene alvo (representados pelas sequências em negrito) foram desenhados flanqueando regiões de exons, utilizando a sequência dos transcritos .1 a .6, disponível na base de dados específica de soja SoyKB, com auxílio do programa *Primer3Plus* (<[www.bioinformatics.nl/primer3plus](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus)>).

```

ATG GACGCATACTCCTCCGGCGAAGAAGTGGTTGTTAAGACGAGAAAACCATATACAATCACTAAGCAAAGGGAACGA
TGGACAGAGGAGGAGCATAAATAGGTTTCTTGAAGCTTTGAAACTACACGGGCGAGCATGGCAGCGCATAGAAGAGCAT
ATAGGAACAAAGACTGCCGTGCAAAATCAGGAGTCACGCACAAAAGTTCTTTACAAAGCTGGAGAAAAGAGGCCCTTGTA
AAGGGTGTTCCAATTGGAAAGGCTCTTGATATAGACATTCGCCCTCCACGGCCCAAAGAAAACCAAACAATCCTTAT
CCTCGGAAGACCAGGATTTGGTAGCGCATATTACATAGTGGAGCAAAGGATGGAAAACCAATTTAGTTGAATCTTCA
CATGTTAACCAAGCACTGAACCTGGAAAAAGAACCCTCCAGAGAAACATGATTTAGATGAAGGGATAACAACCTGTA
AAAGAAAATAAGGATGAGAACCAGGAGCAGTATTTACTCTTCCAGGAGGTACCCTGTTCTCTGTATCTTCAGCA
AACAAGAGTTCAATAACAATGTCAGTGCACCTGGGAAATCCATGTGCCTTCAAGGAGATTACACCTTCAGTGAAGAG
GTAATTCACGAGATGAAAAAACTGAATCTTTTGTCACTATTGAACTTGAAAATGGGACGTTGGAGATCAATGATAGA
AAACAGACTAATGGCACTAGTAAAGACTCCACGTTAGAAATTTCTGATGCTTTACATATGAAAATGGTCCAAAATGAG
AAAACAGATGGTCTTGATTGTGCATTAACAATAGATGGGATGCAAGGCAATCAGAATTACCCTAGACATGTTACTGTG
CACGTTGTTGACGGGAACCTTGGAAACAATACTCAAAAATCCATCACAAGATATGTTGTTTCGAGACTCTATGTTTCAG
CCAATAGGAGGGGTTAATGGACAACAATAATGTTTCCACCAATTCAGCTCCATCGAACACAAGTGAAGTCAAAAATAAC
ACTGTGCGATCTTCTGTTTCATCAGTCAATTTCTTCCCTTATCCTCCCTTACACACAACAACAAGACGATTGCCAATCA
TTTTTTCACATGCTTCAACATTTTCAAATCTTATTATCTCTACCTTGATGCAAAACCCAGCAGCCCATGCTGCAGCA
AGTTTCGCTGCTACATTTTGGCCCTATGCAAAATCCAGAAACTTCAGCAAATTTCTCTAGGTGCTCCCAAGGAGGTTTT
ACAAAATAGACAAAATGGTTCCCTCCAAAGCGTTGCAGCTATTGCAGCTGCCACTGTAGCTGTGCAACTGCATGGTGG
GCAGCTCATGGATTGCTTCCTTTGTGTGCT CCTCTTCATACTTCTTTTGC CTGTTCTCCTGCATCGGTGACT
GCAGTTCATCAATGAATACGGGTGAAGCACCAGGCACTGAAGGCAGAGCAAGAAAAGACTACTCTACAAAATCCTCCT
CTTCAAGATCAGATGCTGGATCCAG AATACTCGGAAGCTCAAC AAGCTCAACATTCAGCTTCAAAGTCAACA
GCTGCCATTTTATCAGATTCTGAGAGTGGAGATGCCAAGTTAA TACTTCATCAAAGGCTACTG ATCATGAG
ACGAACAAAACAATTCACGAGCACCTAGATTCCA ACA AAACAAAGGGCAGAAAAC CGGTTGACCGTTCCTCA
TGTGGTTCCACACGGGCTCTAG CAGCGATGTGAAACTGATGC ACTAGAGAAGGGTGAGAAAG GGAAGGAA
GAGCCTGAAAC ACCTGATGCTAACCAATTA GCCATTGACTTTAGTAATCGTCTGATAGAAGTGT TAGCAATCTT
ACTGATCTTGAAGAGGTTCTCTGAA AGGGGAGACTGGCCTTT CAGGCTCTATTCTCCAGAGAGGTTGTGCC TCAA
AGCTTTTCACTCCTCATGCTTTGAAGAATAAGAATCAGCAAATGGACAACGCCAATAATAACAAGCAAACAT AGA
TGACAAAGACGAAGATC CTGACAGCAAGAAATGCAGTTCTAATTATGAAGCAATGCAGAAAACCTGCCATT
GTAGAAAATAACGAGGGACTGTTAACCATAGGGCTTGACAAAGGAAAGCTTAAGACTCGTCAACAGGCTTTAAACCC
TACAAAAGATGTTCCATGGAGGCCAAGAAAATAGGGTTGGAGCGAGCAACAATCAAGGTGAAGAGCAAGGTTGTAAG
AGAATACGTTTGAAGGGGAGACTTCGACT TGA

```

Fonte: SoyKB.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, composta por tampão de reação 1X (Invitrogen), 0,2µM de cada iniciador *Forward* e *Reverse*, 0,4mM de dNTP's (Invitrogen), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen), 1U de TaqDNA polimerase (Invitrogen) e 3µL de cDNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Veriti®* (*Applied Biosystems, Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos*) e a ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s e finalizando com um ciclo de 72°C por 15 min. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com coloração por brometo de etídio (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS, 1989) e visualizados em transluminador de luz ultravioleta (UV) *Loccus* modelo L-PIX, as imagens foram capturadas digitalmente através do *software* L-PIX *Image EX*.

#### 4.2.5 Sequenciamento Produto de PCR

Os produtos de amplificação do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4*, foram purificados utilizando kit *Wizard SV Gel and PCR CleanUp* (*Promega*) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de amplificação para o sequenciamento, foi realizada em volume final de 20µL composta por 3µL do produto de PCR purificado, 0,32pmol dos mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR convencional separadamente, e o master mix do *kit Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (*Thermo Fisher Scientific*) seguindo as recomendações do fabricante. A ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 94°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15s, 50°C por 15s e 72°C por 4 min. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado por precipitação alcoólica e ressuspendido em 10µL de Hi-Di Formamida (*Thermo Fisher Scientific*). As amostras foram então, desnaturadas por 5 minutos a 95° C e imediatamente resfriadas em gelo. A separação dos fragmentos foi realizada em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

#### 4.2.6 Alinhamento das sequências obtidas

Foi realizado alinhamento local das sequências de DNA e cDNA obtidas pelo sequenciamento e a sequência presente nos transcritos de .1 a .6 do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, disponível na plataforma SoyKB, utilizando NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)).

#### 4.2.7 Análise da expressão gênica via RT-qPCR

O perfil de expressão do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* ao longo do ciclo circadiano nas amostras submetidas a estresse moderado (30% GH) em relação à situação de tratamento sem estresse (70% UG), foi determinado utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A expressão gênica foi avaliada em três repetições biológicas independentes, cada uma avaliada em três repetições técnicas. As reações de qPCR foram conduzidas em termociclador Step One Plus (*Applied Biosystems*) utilizando-se o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os pares de primers utilizados para o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* foram: sequência F – AGCACCTAGATTCCAACAAAACA e sequência R – TCTCTAGTGCATCAGTTTCCACA. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas logo após o final de cada reação de quantificação. Na dissociação, os produtos de amplificação foram submetidos a temperaturas de 60 a 95°C. Os valores do limiar do ciclo normalizado (Ct) foram calculados com base na expressão do gene endógeno ( $\beta$ -actina, Glyma15G05570 – Sequência F – GAGCTATGAATTGCCTGATGG e R – CGTTTCATGAATTCCAGTAGC) previamente identificados como expresso de forma estável em muitos estágios de desenvolvimento e situações de estresse. A expressão normalizada (EN) foi calculada usando a seguinte fórmula:  $EN = 2^{-\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ normalizador}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 BUSCA DA SEQUÊNCIA DO GENE *LHY/CCA1-like/LCL-4* EM SOJA NO PHYTOZOME

Como organismos sésseis e impossibilitados de evitar condições ambientais adversas, as plantas desenvolveram ao longo da evolução mecanismos adaptativos visando sua sobrevivência e reprodução. Assim, através dos ritmos circadianos, os vegetais conseguem aumentar a eficiência de processos fisiológicos sincronizando o *timing* desses processos com ótimas condições ambientais, economizando energia e otimizando seu crescimento e desenvolvimento. Em *A. thaliana*, planta modelo bastante estudada, o oscilador central do relógio circadiano é composto por vários laços de *feedback* interligados que interagem na expressão de dois fatores de transcrição MYB parcialmente redundantes, o *Late Elongated Hypocotyl (LHY)* (AT2G46830) e o *Circadian Clock Associated 1 (CCA1)* (AT1G01060) (GARDNER et al., 2006; HARMER, 2009). Em soja, no entanto, após o Blast realizado com as sequências dos genes *LHY* e *CCA1* de *A. thaliana* (Anexos A e B), foi possível identificar que apenas um gene atua como oscilador central do relógio circadiano, o gene *LCL (LHY/CCA1-like)* como já postulado por Liu et al. (2009) e Thakare; Kumudini e Dinkins (2010).

Os resultados do Blast mostraram alta similaridade (entre 66% e 90,4%) dos genes *LHY* e *CCA1* de *A. thaliana* com alguns Glymas de soja para ambos os genes (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2** – Resultado do Blast realizado com a sequência do gene *CCA1* (AT2G46830) de *Arabidopsis thaliana* no genoma da soja. A região destacada em negrito é onde se encontra o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4*.

Chr	Score	E	Identidade	Glyma		Anotação funcional
Chr19	93.3	1.9E-16	72.9 – 83.1%	Glyma.19G260900	3 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/ Protein CCA-1 related / Myb-like DNA-binding domain
Chr16	89.7	2.3E-15	75 - 92.3%	Glyma.16G017400	6 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/Protein CCA-1 related / Myb-like DNA-binding domain
Chr03	89.7	2.3E-15	75 – 88.9%	Glyma.03G261800	5 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/ Protein CCA-1 related / Myb-like DNA-binding domain
Chr14	87.8	8.2E-15	77.8%	Glyma.14G210600	2 variantes	PROTEIN REVEILLE 1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain
Chr02	87.8	8.2E-15	77.8%	Glyma.02G241000	2 variantes	PROTEIN REVEILLE 1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain
<b>Chr07</b>	<b>86</b>	<b>2.8E-14</b>	<b>75.4 - 90.4%</b>	<b>Glyma.07G048500</b>	<b>8 variantes</b>	<b>MYB-related transcription factor LHY (LHY)/ PROTEIN CCA1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain</b>

Fonte: NCBI.

**Tabela 3** – Resultado do Blast realizado com a sequência do gene *LHY* (AT1G01060) de *Arabidopsis thaliana* no genoma da soja. A região destacada em negrito é onde se encontra o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4*.

Chr	Score	E	Identidade	Glyma		Anotação funcional
Chr19	152.8	2.7E-34	70.8 – 83.6%	Glyma.19G260900	3 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/ Protein CCA-1 related/ Myb-like DNA-binding domain
Chr03	152.8	2.7E-34	70.6 – 83.6%	Glyma.03G261800	5 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/Protein CCA-1 related/ Myb-like DNA-binding domain
Chr16	102.3	4.3E-19	66.9% - 84.4%	Glyma.16G017400	6 variantes	MYB-related transcription factor LHY (LHY)/Protein CCA-1 related / Myb-like DNA-binding domain
Chr18	98.7	5.2E-18	78.9 – 87.7%	Glyma.18G044200	-	PROTEIN REVEILLE 1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain
Chr13	98.7	5.2E-18	78.5 – 87.7%	Glyma.13G152300	-	PROTEIN REVEILLE 1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain
<b>Chr7</b>	<b>96.9</b>	<b>E 1.8E-17</b>	<b>66.5 – 85.9%</b>	<b>Glyma.07G048500</b>	<b>8 variantes</b>	<b>MYB-related transcription factor LHY (LHY)/ PROTEIN CCA1-RELATED/ Myb-like DNA-binding domain</b>

Fonte: NCBI.

Pode-se observar que os resultados obtidos no genoma da soja se repetiram para ambos os genes de *A. thaliana*, apontando os Glymas 19G260900, 03G261800, 16G017400, 18G044200, 13G152300 e 07G048500 como os mais similares aos genes *LHY* e *CCA1* de *A. thaliana*. Consistente com os dados obtidos por Thakare; Kumudini e Dinkins (2010), não foi possível diferenciar os ortólogos putativos de *LHY* e *CCA1* de soja, corroborando os resultados de Liu et al. (2009), que identificou no genoma da soja fatores de transcrição MYB *LHY/CCA1-like* genes (Glyma.07G05410, Glyma.16G01980, Glyma.03G42260 e Glyma.19G45030) e postulou que nesta leguminosa apenas um gene, denominado *LCL* (*LHY/CCA1-like*) atua como oscilador central do relógio circadiano.

Considerando-se que o Glyma.07G048500 possui o maior número de variantes (8) e que o padrão de expressão deste gene foi alterado sob condições de DH moderado (MARCOLINO-GOMES et al., 2014), este gene foi escolhido para as análises de possíveis *splicing* alternativos. Ainda, nesse mesmo trabalho, genes responsivos à seca tais como *DREB-*, *bZIP-*, *GOLS-*, *RAB18-* e *Remorin-like* tiveram seu padrão de expressão rítmica significativamente alterado sob condições de DH moderado, no período da manhã, assim como o gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, sugerindo que este aumento da expressão de *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* nos estágios iniciais de seca pode estar associado à sinalização e ativação de respostas à seca. Especificamente, a indução da expressão dos genes *GmDREB1-like*, *GmDREB2-like* e *GmDREB3-like* sob condição moderada de DH, foi associada ao aumento da expressão do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* no mesmo tratamento e período do dia, sugerindo que este gene pode ter uma importante função na indução de genes DREB de soja. Cabe ressaltar que, sob condições normais de hidratação, a expressão de *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* foi comparável à de seu ortólogo de *Arabidopsis*, com o pico de expressão na madrugada, fortalecendo sua atuação como oscilador do relógio circadiano (MARCOLINO-GOMES et al., 2014).

## 5.2 ANÁLISE *IN SILICO* DAS VARIAÇÕES NO GENE *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* (GLYMA.07G048500) NAS BIBLIOTECAS DE RNASeq DE SOJA SOB DÉFICIT HÍDRICO/CICLO CIRCADIANO

Considerando-se que *GmLHY/CCA1-like/Glyma.07G048500* possui oito transcritos alternativos, uma busca pelos transcritos mais abundantes foi realizada em um banco de dados proveniente de um RNASeq realizado com a cultivar de soja sensível à seca, BR 16 sob condições de DH, em amostras coletadas a cada quatro horas em um ciclo de 24hrs, objetivando-se identificar também possíveis variações de *splicing* alternativo em função do ciclo circadiano.

Depois de processados os dados de sequenciamento, os resultados obtidos não indicaram variação significativa no nível de expressão do Glyma.07G048500 nos tempos amostrados. Comparando-se as sequências de exons descritas no Phytozome para os oito transcritos diferentes do Glyma.07G048500, pôde-se observar que os transcritos de .1 a .6 foram os mais abundantes nas bibliotecas de RNAseq (Tabela 4). O tamanho das sequências presentes nos transcritos de 1 a 8 estão descritos na Tabela 5, juntamente com os tamanhos putativos dos introns.

**Tabela 4** – Transcritos do Glyma.07G048500 presentes e quantidade (x) do transcrito identificados nos tratamentos de déficit hídrico e controle, em soja convencional BR 16, sensível à seca. Dados obtidos a partir de bibliotecas de RNASeq de soja sob déficit hídrico, com coletas a cada 4h em um período de 24hs. Controle (C), Déficit Hídrico (DH).

Tratamento	Transcrito
C 4h	.1 a .6 (1x)
C 8h	.1 a .6 (5x)
C 12h	.1 a .6 (7x)
C 16h	-
C 20h	-
C 24h	-
DH 4h	.1 a .6 (4x)
DH 8h	.1 a .6 (7x)
DH 12h	.1 a .6 (4x)
DH 16h	.1 a .6 (4x)
DH 20h	-
DH 24h	.1 a .6 (2x)

**Tabela 5** – Transcritos do Glyma.07G048500, com detalhes da posição inicial e final e tamanho dos exons presentes em cada transcrito alternativos. Também estão ilustrados os tamanhos putativos dos íntrons considerando as posições no genoma referência de soja, Willians 82. Dados obtidos do Phytozome.

	Exons	Posição Inicial	Posição final	Tamanho exon (bp)	Tamanho íntron (pb)*
Transcritos .1 a .6	CDS	4103714	4105144	1430	-90
	CDS	4105234	4105455	221	-7167
	CDS	4112622	4112683	61	-179
	CDS	4112862	4112973	111	-102
	CDS	4113075	4113113	38	9868
	CDS	4103245	4103631	386	
Transcrito .7	CDS	4113075	4113113	38	251
	CDS	4112862	4112973	111	351
	CDS	4112622	4112683	61	7449
	CDS	4105234	4105455	221	1741
	CDS	4103714	4105144	1430	1899
	CDS	4103245	4103631	386	
Transcrito .8	CDS	4103714	4105015	1301	1770
	CDS	4103245	4103631	386	

\*Tamanho putativo segundo dados do Phytozome

Fonte: o próprio autor.

Pode-se observar que os transcritos de .1 a .6 do gene Glyma.07G048500 foram identificados em ambos os tratamentos (controle e déficit hídrico), no entanto, na condição controle apenas nas primeiras horas do dia (4h, 8h e 12h). No período vespertino e noite o Glyma.07G048500 não foi identificado. No tratamento sob DH, a presença dos transcritos de .1 a .6 foi identificada em todos os horários, inclusive nos períodos de 16h e 24h; apenas no horário de 20h a ausência do Glyma.07G048500 foi mantida. Assim como indentificado neste trabalho, Marcolino-Gomes et al. (2014), também identificaram o pico de expressão do Glyma.07G048500, durante a tarde/noite/madrugada sob déficit hídrico moderado, e na condição controle apenas na madrugada.

Estes dados também foram significativos para desenhar os *primers* da PCR convencional de acordo com os transcritos mais abundantes.

### 5.3 PCR CONVENCIONAL PARA CONFIRMAÇÃO DA RETENÇÃO DE INTRON

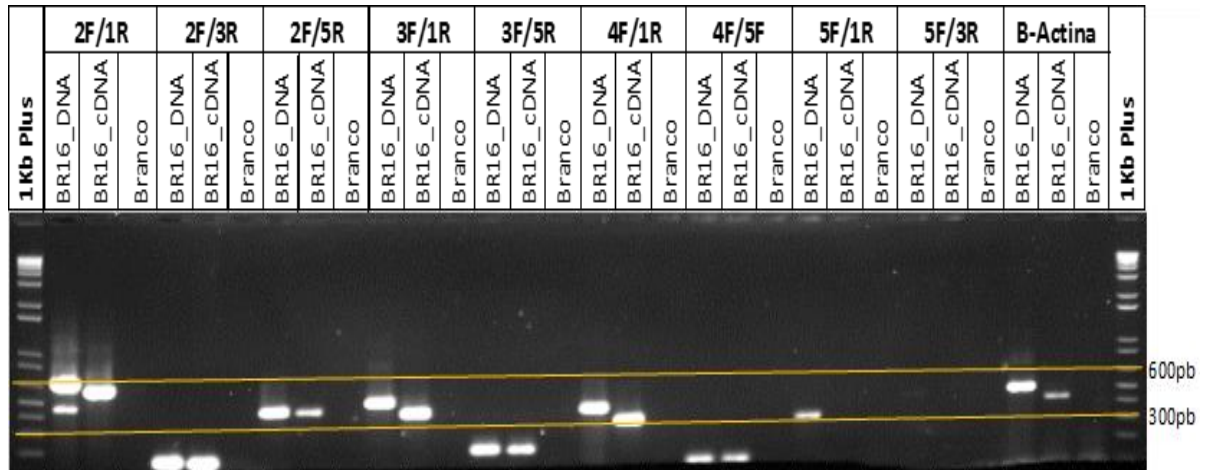
Visando identificar a existência de possíveis mecanismos de *splicing* alternativo em razão da imposição do DH e do ciclo circadiano, um PCR convencional foi realizado. Foram analisadas reações de amplificação de nove combinações de *primers* para identificar retenção de introns no gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, na cultivar BR 16, além de um par de *primers* que flanqueia um intron no gene  $\beta$ -actina de soja como controle da qualidade do cDNA obtido (Figura 7). Em cinco combinações o produto de amplificação obtido tanto no DNA quanto no cDNA apresentaram mesmo tamanho, e em três combinações foi observado variação no tamanho do amplicon do DNA que apresentou tamanho maior que o cDNA, indicando a presença de intron no DNA (Tabela 6, Figura 7) de aproximadamente 80 pares de bases.

A combinação de *primers* identificada como LCL4-E2-F / LCL4-E1-R, que flanqueia os exons de 3 a 6 nas seis variantes mais comuns observadas no alinhamento, apresentou amplicons de 600pb e 580pb para o DNA e cDNA respectivamente. Esses produtos de amplificação observados foram menores que o fragmento de 652pb esperado através da sequência obtida nos bancos de dados (Tabela 6).

Não foram identificados produtos de amplificação que correspondem as variantes 7 e 8 do gene *LCL-4*, indicando que essas variantes não estão presentes nas amostras analisadas (Figura 7).

Os resultados observados demonstram que o gene *LCL-4* não apresenta retenção de introns após o processo de transcrição para a cultivar BR 16.

**Figura 7** – Resultado da amplificação dos iniciadores, na cultivar de soja BR 16, para identificar retenção de introns no gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*. A linha em amarelo está agrupando as bandas com fragmentos de tamanhos aproximados, entre 600 e 300 pb. O marcador *1kb plus* é a base para identificar os tamanhos dos fragmentos.



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 6** – Identificação dos amplicons esperados e obtidos e as regiões flanqueadoras dos exons do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*.

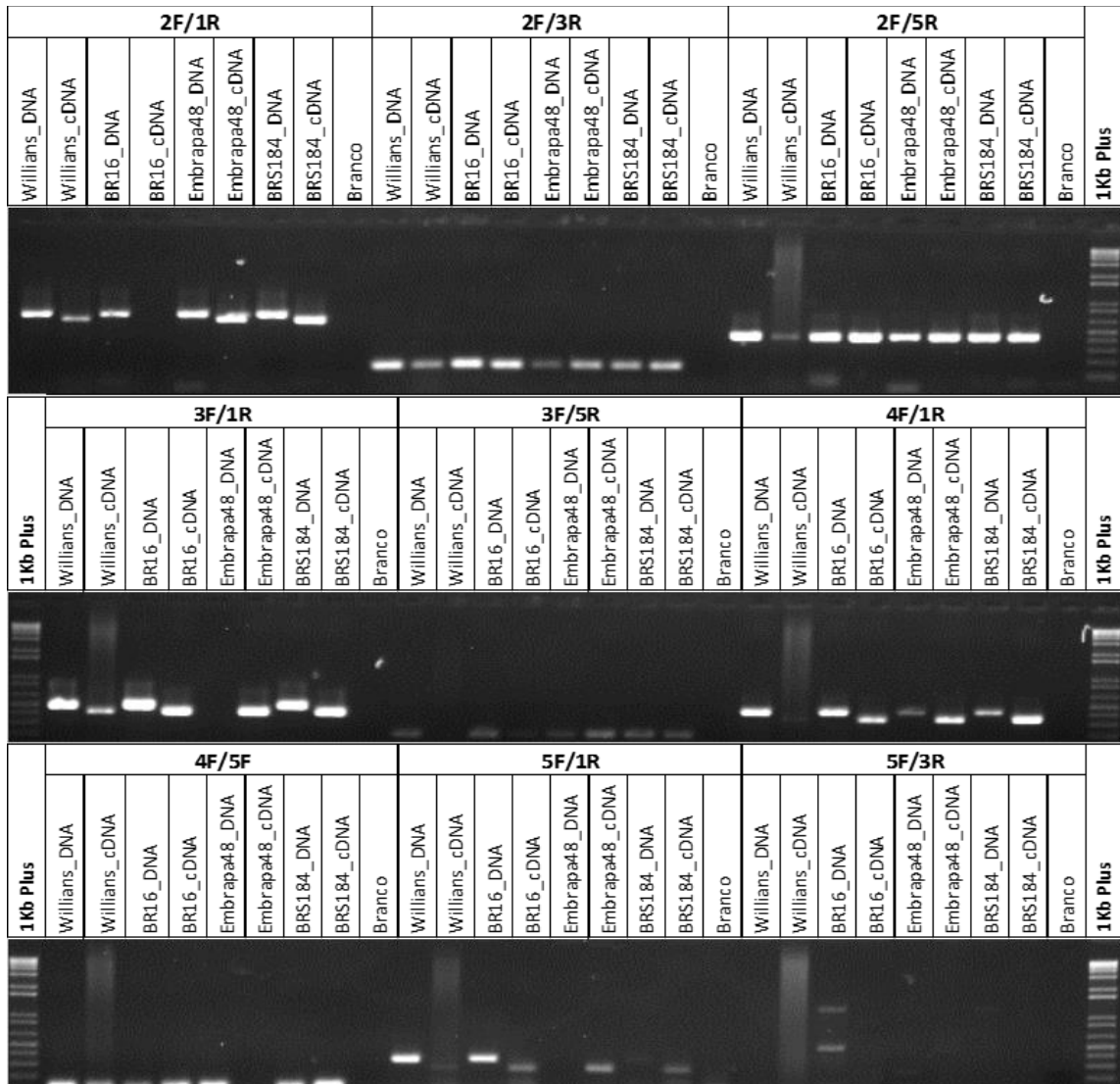
Primers	Amplicon esperado cDNA (pb)	Amplicon observado (pb)		Regiões flanqueadas
		DNA	cDNA	
LCL4-E2-F / LCL4-E1-R	652	600	580	Exons 3, 4, 5 e 6
LCL4-E2-F / LCL4-E3-R	163	160	160	Intron entre exon 2 e 3
LCL4-E2-F / LCL4-E5-R	438	440	440	Exons 3 e 4
LCL4-E3-F / LCL4-E1-R	416	500	430	Exons 4, 5 e 6
LCL4-E3-F / LCL4-E5-R	202	200	200	Exon 4
LCL4-E4-F / LCL4-E1-R	351	400	350	Exons 5 e 6
LCL4-E4-F / LCL4-E5-R	137	140	140	Intron entre exon 4 e 5
LCL4-E5-F / LCL4-E1-R	272	300	300	Exon 6
LCL4-E5-R / LCL4-E3-R	330	--	--	Variante 7
$\beta$ -Actina	520/440	520	440	Intron $\beta$ -Actina

Fonte: o próprio autor.

Para verificar se poderia haver efeito de diferenças no genótipo sobre a transcrição e possível retenção de introns no gene *LCL-4*, foram analisados o

produto de amplificação de DNA e cDNA das cultivares BR 16, Willians 82, Embrapa 48 e BRS 184 com as mesmas nove combinações de *primers* (Figura 8). Não foram observadas diferenças entre os amplicons obtidos nas quatro cultivares, indicando que não há efeito de genótipo nas amostras analisadas.

**Figura 8** – Combinação dos *primers* em diferentes cultivares.

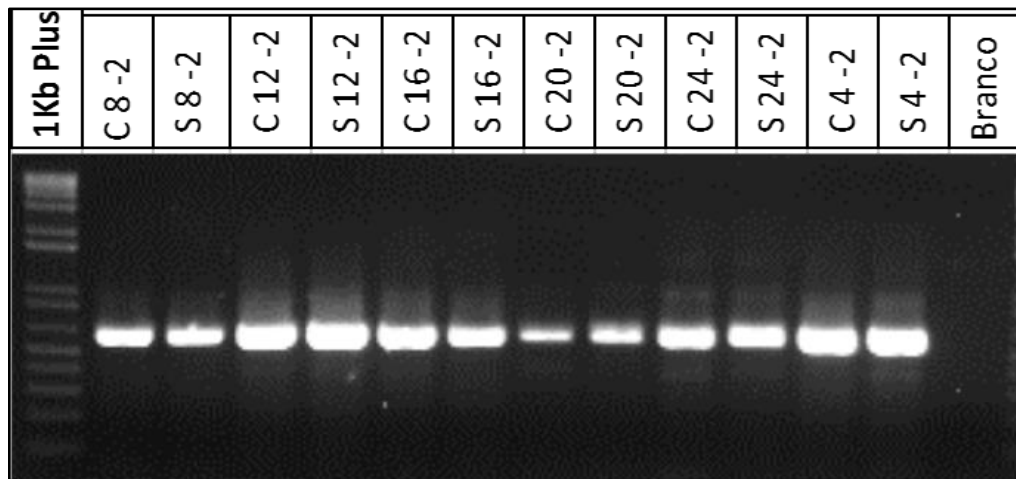


Fonte: o próprio autor.

Finalmente, para verificar o efeito combinado do DH e ciclo circadiano na cultivar BR 16 sobre o processamento do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* (Glyma.07G048500), foi analisado o produto de amplificação obtido com a cultivar BR 16 sob DH coletadas ao longo de 24h com o set de *primers* LCL4-E2-F / LCL4-E1-R, que flanqueia todos os introns da variante 6 do gene *LCL-4*. Não houve diferença no tamanho dos amplicons observados entre as amostras que foram

submetidas ao DH e as amostras controles em todos os tempos analisados, indicando que as variáveis circadianas e DH não afetam o processamento do gene *LCL-4* na cultivar BR 16 (Figura 9). O resultado obtido foi diferente do que ocorreu para *Arabidopsis*, onde se observou um padrão de retenção de introns quando a planta modelo foi analisada em estresse biótico e abiótico, a retenção produziu duas isoformas distintas dentro do mesmo intron quarto, gerando um intron longo e um intron curto que impedem a tradução de comprimento total da proteína CCA1 (FILICHKIN et al., 2015), justamente mostra que acontece algo diferente do que se esperava em soja.

**Figura 9** – Amplificação com *primers* LCL4-E2-F / LCL4-E1-R das amostras da cultivar BR 16 com os tratamentos controle (C) e déficit hídrico (S) nos seis tempos de (8, 12, 16, 20, 24 e 4h).



Fonte: o próprio autor.

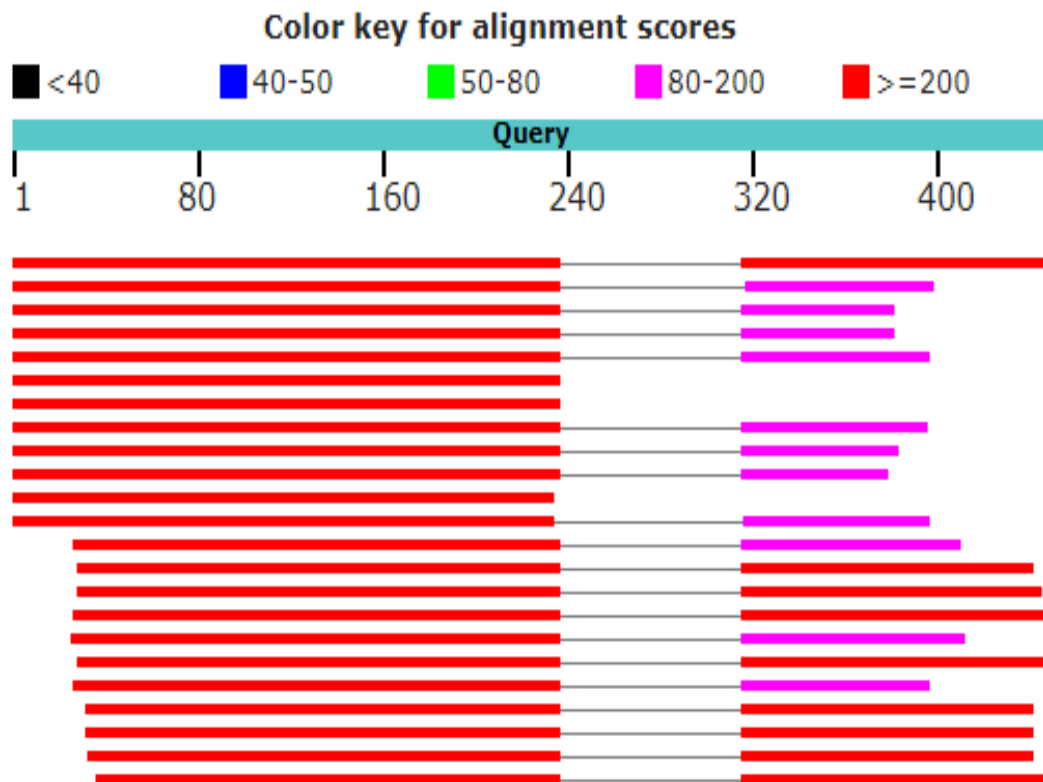
#### 5.4 PRODUTO DE PCR SEQUENCIADO

Apesar de não haver diferença de processamento no gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* nas condições avaliadas neste estudo, foi observado que o produto de amplificação encontrado com o set de primers LCL4-E2-F / LCL4-E1-R não corresponde ao amplicon esperado para esse transcrito, assim, para confirmação dos resultados foi realizado o sequenciamento desse amplicon e alinhamento com sequência obtida *in silico* para identificar as diferenças.

O alinhamento das sequências de DNA e cDNA obtidas com a sequência do transcrito .6 do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4*, mostrou que não há presença dos

introns preditos *in silico* entre os exons 2 a 5, somente foi observado um intron de 80 bases no DNA localizado entre o exon 6 e 1 (Figura 10).

**Figura 10** – Alinhamento sequência do transcrito .6 do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* predita *in silico* e as sequências de cDNA da cultivar BR 16 com os tratamentos controle e déficit hídrico nos seis tempos de (8, 12, 16, 20, 24 e 4h) em relação a sequência de DNA obtida da cultivar BR 16.



**Fonte:** o próprio autor.

A sequência do intron obtida com o sequenciamento corresponde aos seguintes pares de bases: TATCCCAGTTACTACTTGTAATGAAATTTTTATACAATTCTTGCATGTGTTGTTTCTTTCTCATGCCTACTTATTTTCA. O Blast realizado tanto no NCBI quanto no Phytozome, mostrou que essa sequência se alinha diretamente do gene *LCL-4* no intron predito *in silico* com 90pb, sendo esta sequência 94% idêntica à sequência dos bancos de dados.

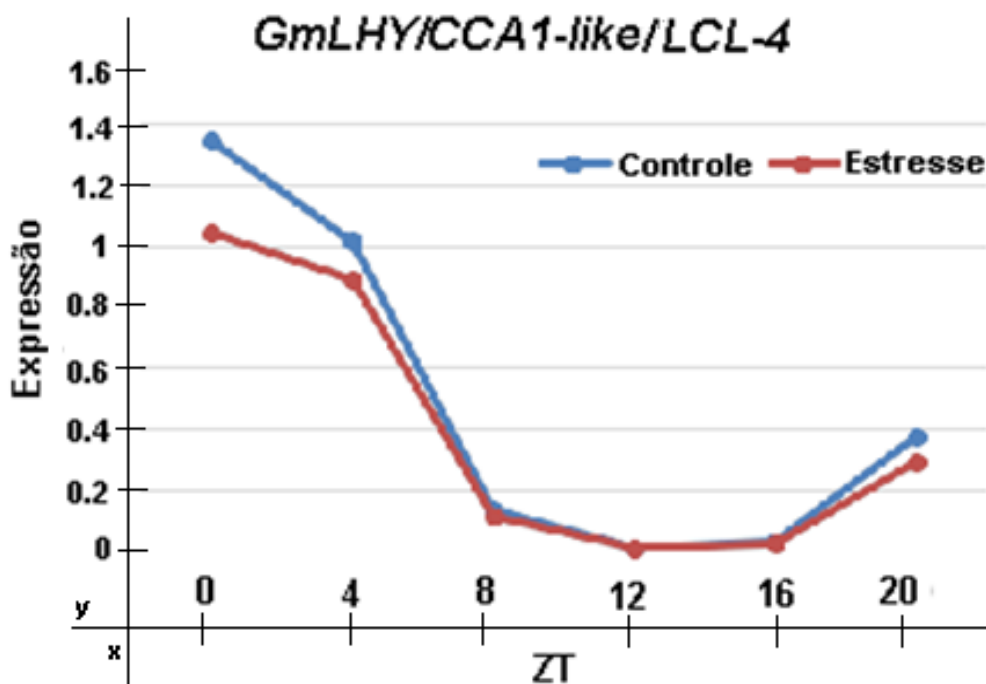
## 5.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO GENE *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO AO LONGO DE 24 HORAS

Altas eficiências de amplificação foram obtidas para o gene alvo *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* e para o gene endógeno  $\beta$ -Actina; respectivamente 98 e 94%.

Os resultados da quantificação da expressão do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* via RT-qPCR mostraram picos de expressão para ambas as condições nos ZTs 0 e 4, correspondentes aos horários de coleta de 8h e 12 horas, seguido de uma baixa expressão do gene nos horários vespertino e noturno (ZT8/16h, ZT12/20h e ZT16/24h) e novamente uma pequena elevação da expressão, ao amanhecer, no ZT20/4h. No entanto, pode-se observar que o nível de expressão foi maior para a condição controle, nos ZT 0 e 4 (Figura 11), quando comparado ao tratamento de déficit hídrico. Este resultado difere dos dados obtidos por Marcolino e colaboradores (2014), que identificaram maior expressão para o tratamento de déficit hídrico moderado (30% de UG), no entanto, corrobora os dados obtidos, por estes mesmos pesquisadores para o tratamento de déficit hídrico severo (15%), onde maior expressão do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* foi identificada para a condição controle, sugerindo que neste experimento, as plantas de soja poderiam estar passando da condição de deficiência hídrica moderada à severa. Esta hipótese é corroborada pelos baixos níveis de expressão, se comparados aos valores obtidos por Marcolino e colaboradores (2014) que foram significativamente maiores (ZT 0 – aproximadamente 13x e ZT 4 – aproximadamente 9x) aos identificados neste trabalho, sugerindo que níveis maiores de expressão poderiam ser alcançados, caso as plantas continuassem por mais tempo (horas ou dias) sob a pressão da deficiência hídrica. Este dado sugere ainda que embora o experimento tenha sido repetido seguindo a metodologia descrita por Marcolino e colaboradores (2014), mudanças de temperatura e umidade do ambiente, controle da temperatura e umidade da câmara de crescimento e ainda da condução do experimento *per se* podem induzir pequenas diferenças na percepção do estresse e na cascata de eventos moleculares induzidos nas plantas de soja em resposta à condição de seca. Cabe ressaltar, porém que estas mudanças não resultaram em alterações na oscilação circadiana do gene, que continuou apresentando picos nos horários iniciais do dia e diminuição da expressão nos horários vespertinos, corroborando a função

biológica do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* no controle do relógio biológico em soja (Liu et al., 2009).

**Figura 11** – Quantificação da expressão do gene *GmLHY/CCA1-like/LCL-4* sob condições de déficit hídrico e controle ao longo de 24 horas, via RT-qPCR. Os dados foram coletados a cada 04 horas. As amostras foram normalizadas utilizando o gene  $\beta$ -actina (Glyma.15G05570). Amplicon obtido de 114 pares de bases. Eficiência de amplificação do gene normalizador de 94%.



Fonte: o próprio autor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Pelos resultados da *análise in silico*, supõem-se que em soja, a função de *CCA1* e *LHY* de *Arabidopsis* seja suprida pelas várias isoformas de *LCL*;
- ✓ Soja x *Arabidopsis* não apresentam o mesmo padrão de retenção de intron, tendo em vista que para o gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* não houve retenção de intron no cDNA;
- ✓ Esse mesmo comportamento foi observado nas quatro cultivares de soja utilizadas nesse estudo, demonstrando que não há influência de genótipo;
- ✓ Apenas um pequeno intron, de aproximadamente 80 pb, apareceu no sequenciamento de DNA de BR 16, diferindo do esperado, de acordo com as análises *in silico* nas bibliotecas de RNASeq e banco de dados Phytozome;
- ✓ O ciclo circadiano e o déficit hídrico mostraram influência na expressão do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* no experimento de RNASeq, visto que na condição controle não detectou-se expressão em alguns horários, enquanto que no déficit hídrico, a expressão foi detectada em todos os horários, com exceção das 20h;
- ✓ Pelos dados de PCR em tempo real, a expressão circadiana do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* não foi alterada na condição de tratamento, mostrando ser modulada apenas em função do ciclo circadiano.
- ✓ A presença do pequeno intron de 80 pares de bases no DNA não alterou a expressão do gene *LHY/CCA1-like/LCL-4* em resposta ao déficit hídrico e a sua oscilação circadiana ao longo do dia (24 hrs).

## REFERÊNCIAS

- AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000g0tfm0kj02wx5ok026zxpqm21bbwa.html>>. Acesso em: 2018.
- ALABADÍ, D.; OYAMA, T.; YANOVSKY, M.J.; HARMON, F.G.; MÁZ, P.; KAY, S. A. Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. **Science**, v. 293, p. 880-883, 2001.
- ALMEIDA, L.A.; KIIHL, R.A.; MIRANDA, M.A.; CAMPELO, G.J. Melhoramento de soja para regiões de baixa latitude. **Circular Técnica: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Distrito Federal, 1999.
- ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>> 2010.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 2017.
- APROSOJA - Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/sobre-a-soja/Os-usos-da-Soja>> Acesso em: 2017.
- ASCHOFF, J. Features of circadian rhythm relevant for the design of shift schedules. **Ergonomics**, v. 21, p. 739-754, 1978.
- ASSAD, E.; PINTO, H. S. Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura. APOSTILA, Posigraf, São Paulo, 2008.
- BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO J. P.; CARVALHO, J. F. C. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; MARUYAMA, K.; KANAMORI, N.; YOSHIDA, Y. F. T.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the ABA-Dependent *AREB1* Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 719–730, 2013.
- BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In: Miysaka, Shiro; Medina, Júlio César. **A soja no Brasil**. Ed. 1. São Paulo, 1062 p. 1981.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 411–424, 2008.
- BIENIAWSKA, Z.; ESPINOZA, C.; SCHLERETH, A.; SULPICE, R.; HINCHA, D. K.; HANNAH, M. A. Disruption of the *Arabidopsis* circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. **Plant physiology**, v. 147, p. 263–279, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114–2120, 2014.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. **Plant Journal**, v. 17, p. 427–431, 1999.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHEN, M.; WANG, Q. Y.; CHENG, X. G.; XU, Z. S.; LI, L. C.; YE, X. G.; XIA, L. Q.; MA, Y. Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 2, p. 299–305, 2007.

CHERNYS, J. T.; ZEEVAART, J. A. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. **Plant Physiology**, v. 124, p. 343-353, 2000.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in plant science**, v. 12, n. 10, p. 444–451, 2007.

COLUSSI, J.; WEISS, C. R.; SOUZA, A. R. L.; OLIVEIRA, L. O agronegócio da soja: Uma análise da rentabilidade do cultivo da soja no Brasil. **Revista Espacios**, v. 37, n.16, 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_01\\_10\\_15\\_07\\_19\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf)>. Acesso em: 2017.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento BR). 2018. **V. 5 - SAFRA 2017/18- N. 6 - Sexto levantamento | MARÇO 2018** (em linha). Consultado 22 Mar. 2018. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18\\_03\\_13\\_14\\_15\\_33\\_grao\\_marco\\_2018.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marco_2018.pdf)>. ISSN: 2318-6852.

COVINGTON, M. F.; HARMER, S. L. The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. **PLoS Biology**, v. 5, p. 1773–1784, 2007.

DEVI, M. J.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K.; VADEZ, V. Relationships Between Transpiration Efficiency and Its Surrogate Traits in the *rd29A:DREB1A* Transgenic Lines of Groundnut. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 4, p. 272–283, 2011.

DÍAZ, H. I.; BUSTO, O.; VELÁZQUES, M.; FERNÁNDEZ, J.; GONZÁLEZ, Y J. ORTEGA. El cultivo de la soya para granos y forrajes. Costa Rica, CIDA. (**Boletín Técnico**). 1992.

DODD, A. N.; SALATHIA, N.; HALL, A.; KÉVEI, E.; TÓOTH, R.; NAGY, F.; HIBBERD, J. M.; MILLAR, A. J.; WEBB, A. A. R. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage, **Science**, v. 309, p. 630- 633, 2005.

DOWSON-DAY, M. J.; MILLAR, A. J. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 17, p. 63-71, 1999.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 751–63, 2003.

EMBRAPA Soja - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/soja-transgenica>>. Acesso em: 2017.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2005. **Sistemas de Produção**, p. 242, 2005.

ENGELS, C., FUGANTI-PAGLIARINI, R., MARIN, S. R. R., MARCELINO-GUIMARÃES, F. C., OLIVEIRA, M. C. N., KANAMORI, N., MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetic Molecular Biology**, v. 36, p. 556–565, 2013.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. 1º ed. Brasília: Departamento de publicações. EMBRAPA-CNPAP, p. 381-392, 1989.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673–689, 2015.

FARRÉ, EM.; HARMER, S. L.; HARMON, F. G.; YANOVSKY, M. J.; KAY, S. A. Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. **Current Biology**, v. 15, p. 47-54, 2005.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da Soja. **Circular Técnica**, EMBRAPA, p. 1-9, 2011.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill1. **Crop Science**, v. 11, p. 929, 1971.

FENG, J.; MEYER, C. A.; WANG, Q.; LIU, J. S.; SHIRLEY LIU, X.; ZHANG, Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2782-2788, 2012.

FERREIRA, R. C. **Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil**. Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Londrina, Centro De Ciências Agrárias, Programa De Pós-Graduação Em Agronomia, Londrina. 2016.

FILICHKIN, S. A.; JASON S. CUMBIE, J. S.; DHARMAWARDHANA, P.; JAISWAL, P.; CHANG, J. H.; PALUSA, S. G.; REDDY, A. S. N.; MEGRAW, M.; MOCKLER, T. C. Environmental Stresses Modulate Abundance and Timing of Alternatively Spliced Circadian Transcripts in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 8, p. 207–227, 2015.

FILICHKIN, S. A.; MOCKLER, T. C. Unproductive alternative splicing and nonsense mRNAs: a widespread phenomenon among plant circadian clock genes. **Biology Direct**, v. 7, p. 20, 2012.

FILICHKIN, S. A.; PRIEST, H. D.; GIVAN, S. A.; SHEN, R.; BRYANT, D. W.; FOX, S. E.; WONG, W. K.; MOCKLER, T. C. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, v. 20, p. 45–58, 2010.

FOWLER, S. G.; COOK, D.; THOMASHOW, M. F. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. **Plant physiology**, v. 137, p. 961–968, 2005.

FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, F. A.; MOLINARI, H. B. C.; MARIN, S. R. R.; MOLINARI, M. D. C.; MARCOLINO-GOMES, J.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; NEUMAIER, N.; KANAMORI N FUJITA, Y.; MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 448, 2017.

GAO, S. Q.; CHEN, M.; XIA, L. Q.; XIU, H. J.; XU, Z. S.; LI, L. C.; ZHAO, C. P.; CHENG, X. G.; MA, Y. Z. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant cell reports**, v. 28, n. 2, p. 301–11, 2009.

GARDNER, M. J.; HUBBARD, K. E.; HOTTA, C. T.; DODD, A. N.; WEBB, A. A. R. How plants tell the time. **Biochemical Journal**, v. 397, p. 15–24, 2006.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 16, n. 4, p. 433–42, 1998.

GORTON, H. L.; WILLIAMS, W. E.; ASSMAN, S. M. Circadian rhythms in stomatal responsiveness to red and blue light. **Plant Physiology**, v. 103, p. 399-406, 1993.

HARMER, S. L. The circadian system in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 357–377, 2009.

HARMER, S. L.; HOGENESCH, J. B.; STRAUME, M.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU T.; WANG, X.; KREPS, J.A.; KAY S. A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. **Science**, v. 290, p. 2110-2113, 2000.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Londrina: Embrapa Soja, Documentos**, ISSN 2176-2937, n. 349, p. 70, 2014.

HONNA, P. T.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; MOLINARI, M. D. C.; MARIN, S. R. R.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MERTZ-HENNING, L. M.; KANAMORI, N.; NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; URANO, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; DESIDÉRIO, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with *AtGo/S2* gene for drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 36, p. 157, 2016.

HOTTA, C. T.; GARDNER, M. J.; HUBBARD, K. E.; BAEK S. J.; DALCHAU N.; SUHITA D.; DODD, A. N.; WEBB, A. A. R. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 333-349, 2007.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 715–41, 2014.

HUDSON, K. A. The Circadian Clock-controlled Transcriptome of Developing Soybean Seeds. **The Plant Genome Journal**, v. 3, p. 3, 2010.

ISODA, A.; WANG, P. Leaf Temperature and Transpiration of Field Grown Cotton and Soybean under Arid and Humid Conditions. **Plant Production Science**, v. 5, p. 224–228, 2002.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant & cell physiology**, v. 47, n. 1, p. 141–53, 2006.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. **Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 553-62, 2000.

JAMES, A. B.; SYED, N. H.; BORDAGE, S.; MARSHALL, J.; NIMMO, G. A.; JENKINS, G. I.; HERZYK, P.; BROWN, J. W.; NIMMO, H. G. Alternative splicing mediates responses of the *Arabidopsis* circadian clock to temperature changes. **Plant Cell**, v. 24, p. 961–981, 2012.

JICA – Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 01 janeiro de 2017.

JOHNSON, C. H.; KNIGHT, M. R.; KONDO, T.; MASSON, P.; SEDBROOK, J.; HALEY, A.; TREWAVAS, A. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. **Science**, v. 269, p. 1863-1865, 1995.

- KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 3, p. 346–350, 2004.
- KHAN, S.; ROWE, S. C.; HARMON, F. G. Coordination of the maize transcriptome by a conserved circadian clock. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 126, 2010.
- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, v. 12, p.357-60, 2015.
- KLAMKOWSKI, K.; TREDER, W. **Agriculturae Conspectus Scientificus** Morphological and Physiological Responses of Strawberry Plants to Water Stress.v.71, n.4, p. 159-165, 2006.
- KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, 2012.
- KULCHESKI, F.R. **Identificação e análise de expressão de microRNAs em soja sob estresse biótico e abiótico**. 184 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.
- LEGNAIOLI, T.; CUEVAS, J.; MÁS, P. TOC1 functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought. **EMBO Journal**, v. 28, p. 3745–3757, 2009.
- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNEL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R.; and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2078-2079, 2009.
- LICHT, M. A.; WRIGHT, D.; LENSSEN, A. W. Soybean Response to Drought. **Agriculture and Environment Extension Publications**, p. 190, 2013.
- LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239–247, 2002.
- LIU, H.; WANG, H.; GAO, P.; XU, J.; XU, T.; WANG, J.; WANG, B.; LIN, C.; FU, Y. F. Analysis of clock gene homologs using unifoliolates as target organs in soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 278–289, 2009.
- LIU, JING-JIE J.; KRENZ, DEANNE C.; GALVEZ, ALFREDO F.; DE LUMEN, BENITO O. Galactinol synthase (GS): Increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science**, v. 134, p. 11–20, 1998.
- LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 13, p. 3509–17, 2010.

MANAVALAN, L. P.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L-S.; NGUYEN, H. T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, p. 1260–1276, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em: 2017.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T. J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H. B. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. L. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.

MARINHO, J. P., KANAMORI, N., FERREIRA, L. C., FUGANTI-PAGLIARINI, R., CARVALHO, J. F. C., FREITAS, R. S., MARIN, S. R. R.; RODRIGUES F. A.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; NEPOMUCENO, A. L. Characterization of molecular and physiological responses under water deficit of genetically modified soybean plants overexpressing the AtAREB1 transcription factor. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, p. 410–426, 2016. doi: 10.1007/s11105-015-0928-0

MÁS, P.; YANOVSKY M. J. Time for circadian rhythms: plants get synchronized. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 574–579, 2009.

MATSUI, A.; ISHIDA, J.; MOROSAWA, T.; MOCHIZUKI, Y.; KAMINUMA, E.; ENDO, T. A.; OKAMOTO, M.; NAMBARA, E.; NAKAJIMA, M.; KAWASHIMA, M.; SATOU, M.; KIM, J. M.; KOBAYASHI, N.; TOYODA, T.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M. *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p. 1135–1149, 2008.

MATSUSHIKA, A.; MAKINO, S.; KOJIMA, M.; MIZUNO, T. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 1002-1012, 2000.

MCCLUNG, C. R. Plant Circadian Rhythms. **The Plant Cell**, v. 18, p. 792–803, 2006.

MIZUNO, T.; YAMASHINO, T. Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p. 481–487, 2008.

NAKAMICHI, N.; KITA, M.; ITO, S.; YAMASHINO, T.; MIZUNO, T. PSEUDORESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, v. 46 p. 686-698, 2005.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em Plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 12–18, 2001.

NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v.37, p. 1426-1434, 1997.

OSOSKI, A. L.; KENNELLY, E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 84-86, 2003.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; RENATO, J.; FARIAS, B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought Tolerance Characteristics of Brazilian Soybean Cultivars: Evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, v. 7, p. 129–137, 2004.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R. M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome/National Research Council Canada = Génome/Conseil national de recherches Canada**, v. 47, n. 3, p. 493–500, 2004.

PENNISI, E. PLANT GENETICS: The Blue Revolution, Drop by Drop, Gene by Gene. **Science**, v. 320, n. 5873, p. 171–173, 2008.

PEREZ-SANTÁNGELO, S.; SCHLAEN, R. G.; YANOVSKY, M. J. Genomic analysis reveals novel connections between alternative splicing and circadian regulatory networks. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, p. 13–24, 2013.

PERTEA, M.; PERTEA, G. M.; ANTONESCU, C. M.; CHANG, T. C.; MENDELL, J. T.; SALZBERG, S. L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 290-295, 2015.

POLIZEL, A. M.; MEDRI, M. E.; NAKASHIMA, K.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R.; DE OLIVEIRA M. C.; MARIN, S. R.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FUGANTI, R.; RODRIGUES, F. A.; STOLF-MOREIRA, R.; BENEVENTI, M. A.; ROLLA, A. A.; NEUMAIER, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARVALHO, J. F.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with rd29A:AtDREB1A for the improvement of drought tolerance. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 10, n. 4, p. 3641–3656, 2011.

PRICE, A. H.; STEELE, K. A.; GORHAM, J.; BRIDGES, J. M.; MOORE, B. J.; EVANS, J. L.; RICHARDSON, P.; JONES, R. G. W. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. **Field Crops Research**, v. 76, n. 1, p. 11–24, 2002.

PRUNEDA-PAZ, J. L.; KAY, S. A. An expanding universe of circadian networks in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 259–265, 2010.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L. S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in Zea mays L. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 50, n. 1, p. 54–69, 2007.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 96, n. 26, p. 15354-61, 1999.

ROCHA, R. S. **Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude**. 59f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

RODRIGO, M. J.; ALQUÉZAR, B.; ZACARÍAS, L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 633–643, 2006.

RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARCOLINO-GOMES, J.; NAKAYAMA, T. J.; MOLINARI, H. B. C.; LOBO, F. P.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. L. Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC Genomics**, v. 16, p. 505, 2015.

ROLLA, A. A.; DE FÁTIMA C. C. J.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; ENGELS, C.; DO RIO, A.; MARIN, S. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; BENEVENTI, M. A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FARIAS, J. R.; NEUMAIER, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Phenotyping soybean plants transformed with *rd29A:AtDREB1A* for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, v. 23, p. 75–87, 2014.

SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167-173, 2008.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **The Plant cell**, v. 18, n. 5, p. 1292–1309, 2006a.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, p. 18822–18827, 2006b.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das Plantas** – Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning Nacional, 2013.

SALOMÉ, P. A.; MCCLUNG, C. R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. **Plant Cell**, v. 17, p. 791-803, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- SANTOS, T. B.; BUDZINSKI, I. G.; MARUR, C. J.; PETKOWICZ, C. L.; PEREIRA, L. F.; VIEIRA, L. G. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.
- SCHAFFER, R.; RAMSAY, N.; SAMACH, A.; CORDEN, S.; PUTTERILL, J.; CARRÉ, I. A.; COUPLAND, G. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. **Cell**, v. 93, p. 1219–1229, 1998.
- SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja\\_2013\\_14.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja_2013_14.pdf)>. Acesso em: 2016.
- SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; PARWEEN, S.; MAJUMDER, A. L. Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? **FEBS Letters**, v. 586, n. 10, p. 1488–1496, 2012.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 2007.
- SIRICHANDRA, C.; WASILEWSKA, A.; VLAD, F.; VALON, C.; LEUNG, J. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 5, p. 1439–1463, 2009.
- STOLF-MOREIRA, R.; MEDRI, M. E.; NEUMAIER, N.; LEMOS, N. G.; BROGIN, R. L.; MARCELINO, F. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 858–867, 2010.
- STRAYER C: Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. **Science**, v. 289, p. 768-771, 2000.
- STRAYER, C.; OYAMA, T.; SCHULTZ, T. F.; RAMAN, R.; SOMERS, D. E.; MÁŠ, P.; PANDA, S.; KREPS, J. A.; KAY, S. A. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an auto regulatory response regulator homolog. **Science**, v. 289, p. 768–771, 2000.
- SULLIVAN, S.; JENKINS, G.; NIMMO, H. Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean. **Plant Physiology**, v. 135, p. 2078–2087, 2004.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 25, p. 614-622, 2004.
- THAKARE, D.; KUMUDINI, S.; DINKINS, R. D. Expression of flowering-time genes in soybean E1 near-isogenic lines under short and long day conditions. **Planta**, v. 231, p. 951–963, 2010.

- TRAN, L-S; NISHIYAMA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. **GM crops**, v.1, n.1, p.32-38, 2010.
- TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water limited environments. **Advances in Agronomy**, v.71, p. 123-193, 2001.
- VADEZ, V.; RAO, J. S.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. DREB1A promotes root development in deep soil layers and increases water extraction under water stress in groundnut. **Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 45–52, 2013.
- VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 189–195, 2006.
- VERGARA, W. L H.; OLIVEIRA, J. P. C.; BARBOSA, F. A.; YAMANARI, J. S. Análise de viabilidade econômico-financeira para aquisição de uma unidade de armazenagem de soja e milho. **GEPROS. Gestão da Produção, Operações e Sistemas**, Bauru, Ano 12, nº 1, p. 41-61, 2017.
- VOLK, G. M.; HARITATOS, E. E.; TURGEON, R. Galactinol Synthase Gene Expression in Melon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 1, p. 8–15, 2003.
- WAN X.; LI, L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hyogogaea* L. **DNA Sequencing**, v. 16, p. 217–223, 2005.
- WANG, Z. Y.; TOBIN E. M. Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. **Cell**, v. 93, p. 1207-1217, 1998.
- WEBB, A. A. R. Stomatal rhythms. In biological rhythms and photoperiodism in plants. (Lumsden P.J.; Millar A.J.), p.66-79. **Bios Scientific Publications**, Oxford, UK. 1998.
- WITCOMBE, J. R.; HOLLINGTON, P. A.; HOWARTH, C. J.; READER, S.; STEELE, K. A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1492, p. 703–16, 2008.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.-K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **PLANT CELL**, v. 14, p. 165–183, 2002.
- YANG, S.; VANDERBELD, B.; WAN, J.; HUANG, Y. Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. **Molecular Plant**, v. 3, p. 469-490, 2010.

ZAGOTTA, M.T.; HICKS, K. A.; JACOBS, C. I.; YOUNG, J. C.; HANGARTER, R. P.; MEEKS-WAGNER, D. R. The *Arabidopsis* ELF3 gene regulates vegetative photo morphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. **Plant Journal**, v. 10, p. 691–702, 1996.

ZHAO, T. Y.; MARTIN, D.; MEELEY, R. B.; DOWNIE, B. Expression of the maize Galactinol synthase gene family: (II) Kernel abscission, environmental stress and myo-inositol influences accumulation of transcript in developing seeds and callus cells. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 647–655, 2004.

**ANEXOS**

**ANEXO A – Sequência .fasta de mRNA do gene *circadian clock associated 1* (CCA1) de *Arabidopsis thaliana* obtida no NCBI**  
 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM\\_180129.4?report=fasta](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_180129.4?report=fasta))

```
>NM_180129.4 Arabidopsis thaliana circadian clock associated 1 (CCA1), mRNA
TTCAGCCACTAGTATGTTGACATATGGCAGTTTCTTTTGTAGCCTCGAAATAAATAAATTA AAAAGTTTG
AGGTTAAAGATAAATTATAGTGGCTGAGATTTCTCCATTTCCGTAGCTTCTGGTCTCTTTTCTTTGTTTCA
TTGATCAAAAAGCAAATCACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCGATTTCTTACTGTTTTCTTATCCAACGAAAT
CTGGAATTA AAAATGGAATCTTTATCGAATCCAAGCTGATTTTGTTCCTTTCATTGAATCATCTCTCTAA
AGTGGAAATTTTGTAAAAGAGAAGATCTGAAGTTGTGTAGAGGAGCTTAGTGATGGAGACAAATTCGTCTGG
AGAAGATCTGGTTATTAAGACTCGGAAGCCATATACGATAACAAAGCAACGTGAAAGGTGGACTGAGGAA
GAACATAATAGATTCATTGAAGCTTTGAGGCTTTATGGTAGAGCATGGCAGAAGATTGAAGAACATGTAG
CAACAAAAACTGCTGTCCAGATAAGAAGTCACGCTCAGAAATTTTTCTCCAAGGTAGAGAAAAGAGGCTGA
AGCTAAAGGTGTAGCTATGGGTCAAGCGCTAGACATAGCTATTCCTCCTCCACGGCCTAAGCGTAAACCA
AACAATCCTTATCCTCGAAAGACGGGAAGTGGAAACGATCCTTATGTCAAAAACGGGTGTGAATGATGAA
AAGATCCCTTGGATCAGAAAAAGTGTGCGATCCTGAGATGGCCAATGAAGATCGACAACAACAAAGCC
TGAAGAGAAAACTCTCAGGAAGACAAGTGTTCAGATTGTTTCACTCATCAGTATCTCTCTGCTGCATCC
TCCATGAATAAAAAGTTGTATAGAGACATCAAACGCAAGCACTTTCCGCGAGTTCTTGCCCTCACGGGAAG
AGGGAAGTCAGAATAACAGGGTAAGAAAAGGAGTCAAACCTCAGATTTGAATGCAAAATCTCTGGA AACCGG
TAATGAGCAAGGACCTCAGACTTATCCGATGCATATCCCTGTGCTAGTGCCATTGGGGAGCTCAATAACA
AGTTCTCTATCACATCCTCCTTCAGAGCCAGATAGTCATCCCCACACAGTTGCAGGAGATTATCAGTCGT
TTCTAATCATATAATGTCAACCTTTTACAAACACCGGCTCTTTATACTGCCGCAACTTTCCGCTCATC
ATTTTGGCCTCCCGATTCTAGTGGTGGCTCACCTGTTCCAGGGAACACCTCCGAATCTGGCTGCCATG
GCCGAGCCACTGTTGCAGCTGCTAGTGCTTGGTGGGCTGCCAATGGATTATTACCTTTATGTGCTCCTC
TTAGTTCAGGTGGTTTCACTAGTCATCCTCCATCTACTTTTGGACCATCATGTGATGTAGAGTACACAAA
AGCAAGCACTTTACAACATGGTTCTGTGCAGAGCCGAGAGCAAGAACACTCCGAGGCATCAAAGGCTCGA
TCTTCACTGGACTCAGAGGATGTTGAAAATAAGAGTAAACCAGTTTGTATGAGCAGCCTTCTGCAACAC
CTGAGAGTGATGCAAAAGGTTTCAGATGGAGCAGGAGACAGAAAACAAGTTGACCGGTCTCTGTTGGCTC
AAACTCCGTCGAGTAGTGATGATGTTGAGGCGGATGCATCAGAAAGGCAAGAGGATGGCACCAATGGT
GAGGTGAAAGAAAACGAATGAAGACACTAATAAACCTCAAACCTCAGAGTCCAATGCACGCCGCAGTAGAA
TCAGCTCCAATATAACCGATCCATGGAAGTCTGTGTCTGACGAGGGTCGAATTGCCTTCCAAGCTCTCTT
CTCCAGAGAGGTATTGCCGCAAAGTTTACATATCGAGAAGAACACAGAGAGGAAGAACAACAACAACAA
GAACAAAGATATCCAATGGCACTTGATCTTAACTTCACAGCTCAGTTAACACCAGTTGATGATCAAGAGG
AGAAGAGAAAACACAGATTTCTTGGAAATCGGATTAGATGCTTCAAAGCTAATGAGTAGAGGAAGAACAGG
TTTTAAACCATACAAAAAGATGTTCCATGGAAGCCAAAGAAAGTAGAATCCTCAACAACAATCCTATCATT
CATGTGGAACAGAAAAGATCCCAAACGGATGCGGTTGGAAACTCAAGCTTCCACATGAGACTCTATTTTCA
TCTGATCTGTTGTTGTA CTCTGTTTTTAAGTTTTCAAGACCCTGCTACATTTTCTTTTCTTTTGGAGG
CCTTTGTATTTGTTTCTTGTCCATAGTCTTCTGTAAACATTTGACTCTGTATTATTCAACAATCATAA
ACTGTTAATCTTTTTTTTTTCCAACCTGGAAAGAACTTCACTCAA
```

Fonte: NCBI.

**ANEXO B – Sequência .fasta de mRNA do gene *Homeodomain-like superfamily protein (LHY)* de *Arabidopsis thaliana* obtida no NCBI**  
 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_180129.4?report=fasta](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_180129.4?report=fasta))

```
>NM_099988.4 Arabidopsis thaliana Homeodomain-like superfamily protein
(LHY), mRNA
TTGTGGCTGAGATTGCTTCTGGCTTCTCTTCTTCTTCTTCCAGTCTTCTTCAGCCTAAAACAGTCTTCCT
TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCCAGTTATCTTCTTCCTTCTTCTCTGTTTTTTAAA
TTTATTTTTAGAGATTTTTTTTTGTTTTGCTTCCGATTTGATTATTTCCGGGAACGATGACTTCTCCGGG
GAGTTCCTGGTGAGATGATAAGTCAGATTGCATACTTGTCTCCATGGCTACTCTCAAGGGTTTTGGC
TGCGGTGGATTTCGTTTGGTTTCTCTAGAATCTAAAAGAGTTATCACAACGGCTTTGCAATTTGAAAACCT
TCATGTTTTGGGAGATCAAAGATGGTTTTCTTTTTTATACTTTACTTGTTAGAGAGGATTTGAAGCAGCGA
ATAGCTGCACCGTCTTATGGATACTAATACATCTGGAGAAGAATTATTAGCTAAGGCAAGAAAGCC
ATATACAATAACAAAAGCAGCGAGAGCGATGGACTGAGGATGAGCATGAGAGGTTTTCTAGAAGCCTTGAGG
CTTTATGGAAGAGCTTGGCAACGAATTGAAGAACATATTGGGACAAAGACTGCTGTTTCAGATCAGAAGTC
ATGCACAAAAGTTCTTTCACAAAAGTTGGAGAAAAGAGGCTGAAGTTAAAGGCATCCCTGTTTGCCAAGCTTT
GGACATAGAAAATTCGCTCCTCGTCTTAAACGAAAACCCAATACTCCTTATCCTCGAAAGCCTGGGAAC
AACGGTACATCTTCTCTCAAGTATCATCAGCAAAAGATGCAAAACTTGTTTTCATCGGCCTCTTCTTCAC
AGTTGAATCAGGCGTCTTGGATTTGGAAAAAATGCCGTTCTCTGAGAAAACATCAACTGGAAAAGAAAA
TCAAGATGAGAATTGCTCGGGTGTCTTACTGTGAACAAGTATCCCTTACCAACGAAACAGGTAAGTGGC
GACATTGAAACAAGTAAGACCTCAACTGTGGACAACGCGTTCAGATGTTCCCAAGAAGAACAAGACA
AAGATGGTAACGATGGTACTACTGTGCACAGCATGCAAAACTACCCTTGGCATTTCACGCAGATATTGT
GAACGGGAATATAGCAAAATGCCCTCAAAATCATCCCTCAGGTATGGTATCTCAAGACTTCATGTTTCAT
CCTATGAGAGAAGAAAACCTCACGGGCACGCAAAATCTTCAAGCTACAACAGCATCTGCTACTACTACAGCTT
CTCATCAAGCGTTTCCAGCTTGTCAATTCACAGGATGATTACCGTTCGTTTTCTCCAGATATCATCTACTTT
CTCCAATCTTATTATGTCAACTCTCCTACAGAATCCTGCAGCTCATGCTGCAGCTACATTCGCTGCTTCG
GTCTGGCCTTATGCGAGTGTTCGGGAATCTGGTGATTCATCAACCCCAATGAGCTCTTCTCCTCCAAGTA
TAACCGCATTGCCGCTGCTACAGTAGCTGCTGCAACTGCTTGGTGGGCTTCTCATGGACTTCTTCTCTGT
ATGCGCTCCAGCTCCAATAACATGTGTTCCATTCTCAACTGTTGCAGTTCCAACCTCCAGCAATGACTGAA
ATGGATCCGTTGAAAATACTCAACCGTTTGAGAAAACAAAACACAGCTCTGCAAGATCAAAAACCTGGCTT
CGAAATCTCCAGCTTCATCATCTGATGATTCAGATGAGACTGGAGTAACCAAGCTAAATGCCGACTCAAA
AACCAATGATGATAAAATGAGGAGGTTGTTGTTACTGCCGCTGTGCATGACTCAAACACTGCCCAGAAG
AAAAATCTTGTGGACCCTCATCCTGTGGCTCAAAATACACCTTCAGGGAGTGACGCAGAAAACCTGATGCAT
TAGATAAAATGGAGAAAAGATAAAAGAGGATGTGAAGGAGACAGATGAGAATCAGCCAGATGTTATTGAGTT
AAATAACCGTAAGATTAAAAATGAGAGACAACAACAGCAACAACAATGCAACTACTGATTCGTGGAAGGAA
GTCTCCGAAGAGGGTCTATAGCGTTTCAGGCTCTCTTTGCAAGAGAAAGATTGCCCTCAAAGCTTTTCGC
CTCCTCAAGTGGCAGAGAATGTGAATAGAAAACAAAGTGACACGTCAATGCCATTGGCTCCTAATTTCAA
AAGCCAGGATTCCTGTGCTGCAGACCAAGAAGGAGTAGTAATGATCGGTGTTGGAACATGCAAGAGTCTT
AAAACGAGACAGACAGGATTTAAGCCATACAAGAGATGTTCAATGGAAGTGAAAGAGAGCCAAGTTGGGA
ACATAAAACAATCAAAGTGATGAAAAAGTCTGCAAAAAGGCTTCGATTGGAAGGAGAAGCTTCTACATGACA
GACTTGGAGGTAACAAAAAATCCACATTTTTTATCAATATCTTTAAATCTAGTGTTAGTAGTTTGCTT
CTCCAATCTTTATGAAAAGAGACTTTTAAATTTTCTTCCGAACATTTCTTTGGTCATGTCAGGTTCTGTAC
CATATTACCCCATGCTTGTCTCTTGTCTCTGTTTGTGTATGCTACTTGTGGTCTATATGTCATCTGCTA
CTACTGTTAATTAACCATTAAGCAATGGATTTGTCTTTATTTCTTTTTAAAAATTTGTGGATATTGATT
GATGAGATCATAAATAGTTTATAATGATAAAAAGATGAACGTACAAAA
```

Fonte: NCBI.