



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA RONCHI MACEDO

**PROSPECÇÃO DE GENES DE SOJA PARA TOLERÂNCIA
À SECA NA FASE REPRODUTIVA**

Londrina
2023



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

CAMILA RONCHI MACEDO

**PROSPECÇÃO DE GENES DE SOJA PARA TOLERÂNCIA À
SECA NA FASE REPRODUTIVA**

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

Orientador: PhD. Alexandre Lima Nepomuceno.
Coorientador: PhD. Liliane Marcia Mertz-Henning.

Londrina
2023

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

R769p Macedo, Camila Ronchi.
Prospecção de genes de soja para tolerância à seca na fase reprodutiva em bibliotecas de RNA-Seq / Camila Ronchi Macedo. - Londrina, 2023.
67 f.

Orientador: Alexandre Nepomuceno.
Coorientador: Liliane Mertz-Henning.
Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Déficit hídrico - Tese. 2. Soja - Tese. 3. Expressão diferencial - Tese. 4. Aborto de flor e vagem - Tese. I. Nepomuceno, Alexandre . II. Mertz-Henning, Liliane . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

CAMILA RONCHI MACEDO

**PROSPECÇÃO DE GENES DE SOJA PARA TOLERÂNCIA À
SECA NA FASE REPRODUTIVA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: PhD. Alexandre Nepomuceno
Embrapa

Dra. Silvana Rockenbach
Embrapa

Dra. Mayla Daiane Correa Molinari
Sempre Agtech

Dra. Juliana Rosa
Embrapa

Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre à frente guiando em momentos de alegrias e dificuldades.

Com muito carinho, também agradeço aos meus pais Marli e Merquides e ao meu irmão Rafael, pelo amor, confiança e apoio nos meus objetivos. Ao meu noivo Bruno, obrigada por todo o companheirismo, amor e paciência ao longo desta fase de entrega e dedicação à minha tese de doutorado.

Em especial ao meu orientador PhD. Alexandre Lima Nepomuceno, pela orientação, oportunidade de crescimento pessoal e profissional, toda troca de conhecimento e confiança ao longo de todas as fases deste projeto. À PhD. Liliane Marcia Mertz-Henning, pela coorientação, correções e sugestões realizadas para melhor direcionar este projeto, sempre com muita paciência e profissionalismo. À Dra. Silvana, Jéssika e Mayla que enriqueceram o trabalho de forma crucial, muito obrigada pela disponibilidade, incentivo, confiança e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Dr. André Vanzella, à Dra. Profa. Fernanda, coordenadores comprometidos com o curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, obrigada por estarem sempre à disposição no meu mestrado e agora no doutorado. Sempre me acolheram com atenção e disposição para cumprir os requisitos e obrigatoriedades do programa. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por todo o conhecimento adquirido ao longo do doutorado.

Aos pesquisadores, os funcionários e estagiários da Embrapa Soja que contribuíram para a realização deste projeto científico. Agradeço em especial aos técnicos e analistas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Ecofisiologia da Embrapa Soja que rotineiramente me orientaram. A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, por compartilharem os momentos mais importantes da minha vida ao longo destes 4 anos repletos de superação. O meu sincero agradecimento e reconhecimento a vocês!

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) e a Empresa GDMSeeds pela disponibilização da estrutura material e financeira para a realização deste projeto.

RESUMO

Foram registradas na safra 2022 quedas de produção da soja comparadas a safra de 2021 causadas principalmente por déficit hídrico. Quando há ocorrência de seca no período reprodutivo da soja, as perdas são intensificadas devido o aborto de flores e vagem diretamente associadas ao rendimento final. Análises de RNA-Seq podem elucidar variações moleculares de respostas à seca. Nesse contexto, o objetivo foi prospectar genes associados ao abortamento em bibliotecas de RNA-Seq de soja submetidas ao déficit hídrico. O déficit hídrico provocou redução nos parâmetros fisiológicos com impactos de 50% sob a taxa fotossintética, efeitos diretos nos componentes do rendimento final em ambos os genótipos, acarretando no aborto de 25% de vagens, com consequente redução de sementes e peso dos grãos. O déficit hídrico aplicado gerou 544 DEGs responsivos à seca, correspondendo a 108 e 436 genes em flores e vagem, respectivamente. Também detectou a regulação negativa de expressão gênica da atividade catalítica e o enriquecimento da atividade do reservatório de nutrientes relacionados à processos metabólicos primários. Foi identificado genes promissores associados ao processo de ativação de abscisão como LRR *Receptor-like serine/threonine*, fatores de transcrição e enzimas modeladoras da parede celular, em destaque as expansinas e hidrolases XTH (*Xiloglucano endotransglucosilase*) que são associados ao abortamento de flores e vagem. Evidenciamos os impactos diretos no rendimento final da soja e genes associados ao abortamento de estruturas como flor e vagem quando há a ocorrência de estresses hídrico na fase crítica de desenvolvimento reprodutivo da soja.

Palavras-chave: Déficit hídrico; Aborto de flor e vagem; RNA-Seq; Expressão diferencial; *Glycine max*.

ABSTRACT

In the 2022 harvest, soybean production drops were recorded compared to the 2021 harvest, mainly caused by water deficit. When there is a drought in the reproductive period of soybean, losses are intensified due to abortion of reproductive structures like flowers and pods directly associated with the final yield. RNA-Seq analyzes can elucidate molecular variations and the expression profile of drought response genes. In this context, the objective was to prospect genes associated with abortion in RNA-Seq libraries in the reproductive phase of soybeans under water deficit. The water deficit caused a reduction in the physiological parameters related to the processes of evapotranspiration and impacts of 50% on the photosynthetic rate. The experiment was effective because it had direct effects on the components of the final yield in both genotypes, resulting in the abortion of 25% of pods, with a reduction in the production of the number of seeds and weight of the grains. The applied water deficit generated 544 drought-responsive DEGs, corresponding to 108 and 436 genes in flowers and pods, respectively. Enrichment of genes involved in the primary metabolic process, regulation of the cellular process, DNA binding were expressed with high demand in the modulation of gene expression. It also detected downregulation of catalytic activity and enrichment of nutrient reservoir activity. Identify genes abscission such as LRR Receptor-like serine/threonine, transcription factors and cell wall modeling enzymes, especially expansins and XTH hydrolases (Xyloglucan endotransglucosylase). We evidenced the direct impacts on the final yield of soybean and genes associated with the abortion of structures such as flower and pod when there is an occurrence of water stress in the reproductive phase of soybean.

Keywords: Water deficit; *Glycine max*; flower and pod abortion; RNA-Seq; genes differentially expressed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ensaio de déficit hídrico controlado aplicado na fase reprodutiva da soja, conduzido em câmara de crescimento para fenotipagem de características responsivas à seca.....29
- Figura 2** – Parâmetros da produção de flores e percepção inicial do déficit hídrico em BR16 e EMBRAPA 48. Interação significativa da floração precoce após 4 dias de déficit de hídrico (NF4) no genótipo EMBRAPA 4832
- Figura 3** – Biomassa sob déficit hídrico em estruturas aéreas nas cultivares de soja BR16 e EMBRAPA 48, após restrição hídrica no estágio de desenvolvimento R2-R4.....33
- Figura 4** – Genes diferencialmente expressos nas cultivares BR16 e EMBRAPA 48 induzidos pelo déficit hídrico comparados à condição controle, em tecidos flor e vagem no estágio de desenvolvimento R2 e R434
- Figura 5** – Heatmat de expressão gênica em soja e prospecção de genes candidatos ao abortamento de estruturas reprodutivas e genes responsivos ao estresse hídrico.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Respostas fisiológicas das plantas de soja dos genótipos BR16 e EMBRAPA 48 com déficit hídrico (DH) e irrigada (Controle) nas fases R2 e R4	30
Tabela 2 –	Produção de flores monitoradas durante 15 dias de florescimento para os genótipos BR16 e EMBRAPA 48 em ensaio controlado de seca	31
Tabela 3 –	Resultados do rendimento final de soja após déficit hídrico no estágio de desenvolvimento R2-R4 entre os genótipos BR16 e EMBRAPA 48	33
Tabela 4 –	Caracterização ontológica das vias metabólicas detectadas a partir do conjunto de dados de RNA-Seq em flor e vagem sob déficit hídrico.....	35
Tabela 5 –	Genes compartilhados e diferencialmente expressos nos genótipos BR16 e EMBRAPA 48 sob seca e perfil de expressão gênica em Log2FC com a respectiva anotação molecular	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa fotossintética
ABA	Ácido abscísico
ANOVA	Análise de variância
AOPs	<i>Aquaporin transporter</i>
AP2	<i>Apetala 2</i>
AREB	<i>ABA Responsive Element Binding protein</i>
AREB1	<i>ABA Responsive Element Binding protein 1</i>
AZ	Zona de abscisão
BOP1/BOP2	<i>Blade on petiole</i>
BR16	Cultivar de soja BR16
BR16-C	Cultivar de soja BR16 em condição controle
BR16-DH	Cultivar de soja BR16 em condição de déficit hídrico
BTB/POZ	<i>BTB POZ domain-containing protein</i>
cDNA	DNA complementar
Ci	Concentração interna de dióxido de carbono
Clor	Teor de clorofila
CO1	<i>Cytochrome oxidase subunit 1</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CRISPR	<i>Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPR/Cas	<i>Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated associated Cas proteins</i>
DEGs	Genes diferencialmente expressos
DH	Déficit hídrico
DREB	<i>Dehydration Responsive Element Binding protein</i>
DREB1A	<i>Dehydration Response Element B1A</i>
DREB2A	<i>Dehydration Response Element B2A</i>
E	Taxa de transpiração
EMBRAPA 48	Cultivar de soja EMBRAPA 48
EMBRAPA 48-C	Cultivar de soja EMBRAPA 48 em condição controle
EMBRAPA 48-DH	Cultivar de soja EMBRAPA 48 em condição de déficit hídrico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FT	<i>Flusing locus T</i>

GO	Ontologia gênica
GOLS	<i>Galactinol Sintase</i>
GRP	<i>Glycine rich protein family</i>
gs	Condutância estomática
H ₂ O	Água
HAESA	<i>Receptor-like protein kinases</i>
HAESA-LIKE2	<i>Receptor-like protein kinases like2</i>
HR	Umidade relativa
Hsp40	Chaperonas da família Hsp40
Hsp70	Chaperonas da família Hsp70
IDA	<i>Inflorescence deficient in abscission</i>
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
LFK1	<i>Serine carboxypeptidase-like 31</i>
LFY	<i>Leafy</i>
lincRNA	RNAs intergênicos não codificadores longos
ACO	<i>Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase</i>
ACS	<i>Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase</i>
Log2FC	<i>Logarithm 2 fold change</i>
LRR	<i>Receptor-like serine/threonine</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Massa seca da parte aérea
MYB	<i>Mieloblastose - MYeloBlastosis</i>
MYB	<i>Mieloblastose – MyeloBlastosis</i>
MYC	<i>Mielocitomatose - MYeloCytomatosis</i>
MYC	<i>Mielocitomatose – MyeloCytomatosis</i>
NAC	<i>NAC transcription factor</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCED	<i>9- cis -epoxicarotenoide dioxigenase</i>
NCED3	<i>Nove-cis-epoxicaroteníde dioxigenase3</i>
NF11	Número de flores após 11 dias de déficit hídrico
NF15	Número de flores após 15 dias de déficit hídrico
NF4	Número de flores após 4 dias de déficit hídrico
NF7	Número de flores após 7 dias de déficit hídrico

Nts	Número total de sementes
Ntv	Número total de vagem
Pg	Peso do grão
rd29A	<i>Response-to-Dehydration 29A</i>
RFO	Rafinose
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
snoRNA	pequenos RNAs nucleolares
snRNA	pequenos RNAs nucleares
TCP1	<i>T- Complex Protein 1</i>
TFs	Fatores de transcrição
TPM	<i>Transcripts per million</i>
WRKY	<i>WRKY DNA-binding protein</i>
WRKY33	<i>WRKY DNA-binding protein 33</i>
XTH	<i>Xiloglucano endotransglucosilase</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	A cultura da soja	14
2.2	Implicações do déficit hídrico na fase reprodutiva	15
2.3	Estratégias biotecnológicas de tolerância ao déficit hídrico	18
2.4	Processos biológicos envolvidos no abortamento de flores e vagens	21
2.5	Análise de dados de Transcriptomas	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Material vegetal e condições experimentais	26
4.2	Análises fisiológicas e de rendimento	27
4.3	Extração do RNA total	27
4.4	Análises do transcriptoma via RNA-Seq	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Parâmetros fisiológicos e de rendimento sob déficit hídrico na fase reprodutiva	29
5.2	Resultados da expressão gênica de flor e vagem via RNA-Seq	34
6	DISCUSSÃO	39
6.1	Parâmetros fisiológicos nas fases R2 e R4 sob déficit hídrico	39
6.2	Parâmetros de produção de flores sob déficit hídrico	41
6.3	Parâmetros dos componentes de rendimento	42
6.4	Parâmetros da produção de massa seca	43
6.5	Parâmetros da expressão gênica na flor e vagem e vias biológicas	43
6.6	Genes de ativação da zona de abscisão induzidos pela seca	45
6.7	Genes responsivos à seca compartilhados em diferentes genótipos	49
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A safra brasileira de soja em 2021/2022 foi de 270 milhões de toneladas, porém houveram quedas de produção de cerca de 14% nos últimos anos devido à restrição hídrica e altas temperaturas nas diferentes regiões do país. Em 2022 os estados mais atingidos pela seca foram Rio Grande do Sul, Paraná e parte do Mato Grosso do Sul, sendo regiões críticas devido as suas influências nos dados de produção nacional (CONAB, 2022).

No entanto, esta produção vem sendo ameaçada, principalmente devido as mudanças climáticas previstas para as próximas décadas. Os riscos inerentes às mudanças climáticas são estimados em o curto prazo (2021–2040), médio (2041–2060) e longo prazo (2081–2100), em diferentes níveis de aquecimento global que em média ultrapassam 1,5°C em menos de uma década. Diante deste cenário, eventos de déficit hídrico poderão ocorrer com maior frequência e intensidade, sendo considerado o principal estresse abiótico capaz de prejudicar o desenvolvimento e a produtividade de culturas economicamente importantes, como a soja em curto prazo (IPCC, 2022).

A ocorrência de déficit hídrico é altamente prejudicial à soja, principalmente, quando coincide com seu período reprodutivo, que compreende ao período entre o florescimento e a formação de vagens (FEHR, W. R. et al., 1971). Análises fenotípicas em cultivares de soja demonstraram que eventos de déficit hídrico em R2 resultaram em abortamento de flores, reduzindo o número de vagens e sementes produzidas. De modo similar, a ocorrência de déficit hídrico em R4 leva a redução no número de vagens e, conseqüentemente, no número de grãos (DESCLAUX *et al.*, 2000). Resultados de monitoramento hídrico a campo, demonstraram que a produtividade da soja declinou de 3,8 kg ha⁻¹ para 1,2 kg ha⁻¹ quando houve estiagem nos períodos de florescimento e formação das vagens, levando a expressiva redução da produtividade (DESCLAUX *et al.*, 2000).

Ao longo dos últimos anos, diversas estratégias têm sido utilizadas para minimizar efeitos da seca nas culturas agrícolas. Atualmente, a engenharia genética e ferramentas biotecnológicas possibilitaram o desenvolvimento e o avanço de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico. Estratégias para tolerância ao déficit hídrico foram desenvolvidas por meio de transgenia em soja via inserção de genes de *Arabidopsis*, que estão envolvidos em vários processos biológicos associados à resposta à seca, como os genes *DREB1A* (MARINHO *et al.*, 2015), *GOLS* (HONNA *et al.*, 2016), *AREB1* (FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017) e *NCED3* (MOLINARI *et al.*, 2020).

Com o avanço das técnicas de engenharia genética, como o desenvolvimento da ferramenta de edição de genomas CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a identificação de genes endógenos responsivos a seca afim de editá-los e obter plantas não transgênica vem sendo demandada para garantir maiores democratização das ferramentas técnicas a nível mundial. Para tal, é primordial identificar qual ou quais são o(s) gene(s) de maior efeito durante os eventos de seca. Assim, estudos de prospecção de genes direcionadas por técnicas como RNA-Seq relacionados aos mecanismos de resposta ao déficit hídrico em plantas visa entender e identificar os genes endógenos de melhoria da espécie. Uma vez que a identificação de tais genes é indispensável para elucidar funções moleculares e processos biológicos envolvidos em condição de seca, e assim encontrar os genes-chave capazes de desencadear mecanismos de tolerância em culturas como a soja através de edição gênica. Nesse sentido, buscou-se prospectar quais genes e como estes afetam o desenvolvimento de estruturas reprodutivas, como flores e vagens da soja avaliados fenotipicamente por parâmetros fisiológicos e de respostas dos componentes de rendimento.

O abortamento de flores e vagens é um dos principais obstáculos que impedem que a soja atinja seu máximo potencial produtivo. Sabe-se que, uma vez que o mecanismo do abortamento de flores e vagem é ativado, o processo de perdas é irreversível (ESTORNELL *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014). Dessa forma, a geração de genótipos de soja tolerantes ao abortamento devido à seca, é uma alternativa para obtenção de plantas de soja tolerantes ao déficit hídrico. A identificação e a alteração na expressão de genes responsivos à seca, envolvidos no abortamento de flores e vagens, poderá ser utilizada com o propósito de obter plantas mais adaptadas à ocorrência de eventos de déficit hídrico. Nesse sentido, uma vez identificados tais genes alvo, etapas futuras envolvendo a tecnologia CRISPR/Cas pode ser utilizada para modular a expressão dos genes associados ao abortamento de estruturas reprodutivas e, assim, minimizar perdas na produtividade da soja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é pertencente à subfamília Fabaceae da família Leguminosae, cujas plantas apresentam reprodução por autogamia. Na soja, os órgãos reprodutores masculinos e femininos ficam protegidos dentro da corola, que pode apresentar coloração branca, púrpura ou tons variando entre ambas as cores dependendo da cultivar (BORÉM, 2005). Dentre as plantas leguminosas, a soja é considerada uma das mais importantes, devido a composição dos seus grãos, constituídos por 20% de óleo, 38% de proteína e 34% de carboidratos, podendo variar essas proporções de acordo com o genótipo (SEDIYAMA *et al.*, 2005; EMBRAPA, 2011).

Os grãos de soja podem ser utilizados de diversas formas, desde o uso na alimentação humana, produção de ração animal até a produção de biocombustíveis. Na alimentação humana, a soja é utilizada como óleo de soja refinado, farinha, carne de soja, leite de soja, molho de soja *shoyu*, entre outros. Já na alimentação animal, o farelo da soja é utilizado na produção de rações para aves, bovinos, caprinos, ovinos, suínos e pescados. Nos últimos anos, houve uma crescente demanda da produção de novos combustíveis renováveis de fonte vegetal, considerada uma estratégia mais sustentável por causar menos danos ao meio ambiente do que os combustíveis fósseis. Assim, a utilização da soja para produção de biocombustíveis é um exemplo de recurso vegetal a partir do óleo extraído do grão, visando o fornecimento de energia limpa para a indústria de biodiesel (SANTOS *et al.*, 2011).

Na safra 2021/2022, a produção brasileira de soja foi de 270 milhões de toneladas, o que torna esta *commodity* a de maior destaque no setor do agronegócio nacional (CONAB, 2022). A produtividade de qualquer cultura, inclusive a soja, é dependente de condições ambientais favoráveis para alcançar seu máximo rendimento. No entanto, a ocorrência cada vez mais frequente de episódios de estresses abióticos, como a seca, tem dificultado a manutenção de tais resultados. Foi registrado queda de 9,2% na produtividade brasileira da soja comparada a safra 2020/2021 para regiões do país. Essa redução foi ocasionada principalmente pela restrição hídrica associada a altas temperaturas atingindo principalmente estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2022).

No caso da soja, especificamente, episódios de seca durante o período reprodutivo causam redução drástica no rendimento de grãos, devido ao maior abortamento de flores e vagem, menor número de grãos por vagem, redução no período de enchimento de grãos e

qualidade, e a aceleração da senescência foliar. Estas perdas fazem com que a fase reprodutiva da soja seja a mais sensível ao déficit hídrico (NEUMAIER *et al.*, 2000; DESCLAUX *et al.*, 2000).

2.2 Implicações do déficit hídrico na fase reprodutiva

A capacidade das plantas de tolerarem condições de déficit hídrico envolve uma série de mecanismos de defesa a fim de garantir o sucesso reprodutivo (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Durante o desenvolvimento completo da soja desde a sua semeadura, é necessário de 450 a 800 mm de água para obter o rendimento máximo de produção. Sendo que o pico máximo de necessidade da água ocorre no período de floração e enchimento de grãos, decrescendo logo após essa etapa, com o início da maturação. A exigência hídrica da soja no período de floração e enchimento dos grãos até início de maturação (R3-R7) corresponde a 7 a 8 mm dia⁻¹. Diferentemente do que ocorre na fase de crescimento vegetativo, cuja necessidade média das plantas é de apenas 1,0 a 1,5 mm dia⁻¹. A partir do estágio R8 na fase de maturação plena, o consumo médio de água da soja é de 3,2 mm dia⁻¹, devido ao início de perda de água ocasionado pela maturação fisiológica. Na fase de maturação fisiológica dos grãos, estes se desligam da planta mãe, cessando a translocação de fotoassimilados, o que leva ao decréscimo do teor de umidade e alterações na coloração verde e tamanho dos grãos (FEHR; CAVINESS, 1977).

A ocorrência de déficit hídrico durante a formação de vagens e enchimento de grãos também resulta em peso de grãos reduzidos, fato comprovado via estudos em campo de soja com e sem irrigação. Esses estudos evidenciaram que o tamanho e o peso dos grãos são os componentes de produção mais sensíveis ao déficit hídrico quando este ocorre na fase reprodutiva (DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000; RAMBO *et al.*, 2003).

A investigação do efeito do déficit hídrico sobre genes responsivos à seca durante o desenvolvimento de flores e vagem é uma importante estratégia de melhoramento molecular. Essas informações são abrangentes em análises do transcriptoma de *Arabidopsis*, considerada organismo modelo para estudos de genética de plantas dicotiledôneas. Em *Arabidopsis*, a seca afeta a expressão de vários genes responsáveis pelo desenvolvimento floral, levando ao desenvolvimento anormal de anteras, menor viabilidade do pólen, redução do alongamento do filamento, abortamento de óvulo e falha na abertura das flores, resultando em abortamento de flores e frutos (DESCLAUX *et al.*, 2000; LE *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2013). Estudo de RNA-Seq em flores e vagem de soja elucidaram os primeiros genes relacionados ao processo de floração

e suas interações através de análises da ortologia gênica entre genes expressos de *Arabidopsis thaliana* e soja. Existem vários genes ortólogos do processo de florescimento e respostas possivelmente semelhantes entre essas espécies, uma vez que diferenças são encontradas devido a várias duplicações, deleções e ganhos em sequências gênicas durante o processo de diversificação da espécie (SCHMUTZ et al., 2010, JUNG et al., 2012; MOLINARI et al., 2022).

Durante o período de percepção de seca, a quantidade limitada de água e nutrientes é distribuída priorizando o desenvolvimento de flores mais velhas e sementes imaturas, as quais já tiveram sucesso na fertilidade a fim de balancear a distribuição de nutrientes entre novos órgãos da planta e os órgãos já existentes. O abortamento de sementes funcionaria como um mecanismo biológico vantajoso evolutivamente visando direcionar água e nutrientes que estão limitados sob déficit hídrico para o desenvolvimento de um menor número de sementes (SU et al., 2013).

Análises moleculares na fase reprodutiva de trigo (*Triticum aestivum*) e arroz (*Oryza sativa*) em condição de déficit hídrico, mostraram alteração na regulação de genes associados a esterilidade masculina, levando a uma redução significativa da produção de grãos de pólen (SHEORAN; SAINI, 1996; LALONDE et al., 1997; SAINI, 1997). Já em plantas de milho (*Zea mays*), foi relatado que o efeito drástico do abortamento de embriões é maior após a polinização (ANDERSEN et al., 2002). Esse fato foi associado à ativação pelo ácido abscísico (ABA) de mecanismos de sinalização molecular que atuam na senescência em ovários, resultando em maior esterilidade feminina de milhos fertilizados em situações de seca (KAKUMANU et al., 2012).

Em soja, os estudos sobre as respostas da expressão gênica à seca foram realizados durante a fase vegetativa e, recentemente foi avaliado os genes expressos em resposta ao déficit hídrico durante a fase reprodutiva em tecidos como flor e vagem na cultivar BR16, tecidos estes ligados diretamente ao rendimento de grãos (MOLINARI et al., 2021). Foram identificados o gene da família de proteína Hsp20 de choque térmico (Glyma.19G011400), enzima 9-cisepoxicarotenoide dioxigenase (NCED) (Glyma.08G176300 e Glyma.15G250100), genes relacionado ao hormônio como proteína transportadora de auxina (Glyma.03G063900), receptor ABA (Glyma.11G233300) e etileno (Glyma.18G148000), genes associados a fotossíntese/fechamento de estômatos como a proteína fosfatase 2C (Glyma.07G164400) e genes da biossíntese e transporte de açúcar (Glyma.12G032600, Glyma.13G213300 e Glyma.14G159900). Através dessa análise de expressão gênica em larga escala via RNASeq, evidenciou uma maior quantidade de genes com perfil regulados negativamente em flores, e de forma contrária uma maior quantidade de genes com perfil regulado positivamente em vagens.

O que foi relacionado com tecido de flores, sob condições de seca o controle genético tende a inibir a expressão gênica, demonstrando maior sensibilidade ao estresse hídrico. Em vagens, os genes e vias reguladas positivamente, indicaram maior ativação da maquinaria molecular. Segundo os autores, em tecidos da vagem esta estratégia foi associada com a sobrevivência e a aclimatação da formação de vagens para preservar e transmitir material genético para a próxima geração através do sucesso na formação de grãos, mesmo sob o agravante ambiental na produção final de restrição hídrica (MOLINARI et al., 2021).

Os mecanismos mais conhecidos de resposta à seca podem ser divididos em evasão, tolerância e escape. A evasão está relacionada à manutenção do turgor celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante, quanto pela redução da perda por transpiração, pela cutícula ou via fechamento estomático. Já a tolerância à seca é um mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos, devido principalmente, ao acúmulo de solutos compatíveis como as proteínas osmoprotetoras e à capacidade antioxidante (VERSLUES *et al.*, 2006). Enquanto no mecanismo de escape, as plantas apresentam desenvolvimento fenológico rápido, sendo capazes de completar seu ciclo de vida antes que o déficit hídrico se torne severo o bastante para provocar danos fisiológicos. Assim, a planta acelera seu desenvolvimento e pode completar seu ciclo de vida de forma precoce (HEATHERLY; ELMORE, 2004). Além disso, também pode ocorrer o atraso do florescimento, com aparecimento de flores tardias, principalmente em episódios de seca de curta duração, visando estender o estágio reprodutivo, pois, quando a umidade retornar, as flores tardias podem compensar a perda de flores que ocorreu durante o período de estiagem (TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001; SALEHILISAR; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, 2016).

Do ponto de vista hormonal, a sinalização molecular via ABA, ativa processos chaves do metabolismo de fitormônios como o etileno e a auxina, que são os principais atuantes no processo de abortamento de flores e vagem. As condições de déficit hídrico podem induzir a ativação de vias metabólicas mediadas pelo ABA, direcionando esse hormônio para estruturas reprodutivas, onde desencadeia uma rede de interações gênicas que resultam na mudança de concentração hormonal e acarreta no abortamento de flores e vagem (LIU; JENSEN; ANDERSEN, 2004). O déficit hídrico também afeta processos importantes para o desenvolvimento da planta como a fotossíntese, reduzindo a disponibilidade de fotoassimilados necessários para a formação das sementes, o que prejudica a fase de enchimento de grãos (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Para aprofundar o conhecimento e elucidar as funções

moleculares e vias biológicas associadas ao abortamento de estruturas reprodutivas em resposta à seca, é de suma importância identificar os genes envolvidos na ativação desses mecanismos de resposta em diferentes culturas, incluindo a soja. A prospecção de tais genes permitirá o uso de estratégias biotecnológicas para o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca.

2.3 Estratégias biotecnológicas de tolerância ao déficit hídrico

As principais respostas fisiológicas da planta sob seca vão desde o fechamento dos estômatos até a alteração da taxa fotossintética e de transpiração, levando ao decréscimo da produção da área foliar e a aceleração da senescência das folhas (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; NAKASHIMA; SUENAGA, 2017). Estas respostas ao déficit hídrico são caracterizadas pela combinação de ações moleculares por meio da ativação ou inativação de genes após a percepção do estresse pela planta (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Em estudos em *Arabidopsis*, a seca levou à expressão diferencial com regulação positiva dos genes *FT* (*Flusing locus T*), *COI* (*Cytochrome oxidase subunit 1*) e *LFY* (*Leafy*) envolvidos na transição do estágio vegetativo para o estágio reprodutivo, por meio da indução do meristema apical da parte aérea a produzir flores ao invés de folhas, evidenciando a influência do estresse ambiental como a seca no comportamento de alterações dos estádios fenológicos (SU *et al.*, 2013). A alteração no perfil de expressão desses genes tornara as plantas capazes de ativar mecanismos de defesa responsáveis por tolerar períodos de duração do estresse hídrico (PEDERSEN, 2004).

Os fatores de transcrição mais conhecidos, ativados pela resposta via ABA são os da família *AREB* (ABA responsivo – *ABA Responsive Element Binding protein*). Esses fatores de transcrição promovem o fechamento estomático nas células vegetais e regulam a expressão de muitos genes ABA-induzidos por seca. Outros fatores de transcrição conhecidos, são o *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding protein*) responsivo a desidratação, e os fatores de transcrição chamado *MYC* (*Mielocitomatose – MyeloCytomatosis*) e *MYB* (*Mieloblastose – MyeloBlastosis*), responsáveis pela modulação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo fotossintético, aquaporinas, prolinas, entre outros compostos celulares (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Outro grupo molecular atuante em respostas à seca são os osmólitos, cuja função é realizar a manutenção do turgor celular, inativação de espécies reativas de oxigênio, e estabilização de proteínas e estruturas celulares. Entre os osmólitos, estão os açúcares pertencentes a família da rafinose, sacarose, trealose e sorbitol, açúcares-álcool como o manitol e proteínas como as chaperonas e as *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*) (SEKI *et al.*, 2007). O entendimento da função destes produtos gênicos é de suma importância, pois permite elucidar seus efeitos fenotípicos na planta sob condições de déficit hídrico, podendo ser alvos de modificação genética utilizando técnicas de engenharia genética.

Uma alternativa para evitar perdas de produtividade na cultura da soja, devido às adversidades climáticas, tem sido a geração de genótipos transgênicos tolerantes à seca, via inserção de genes exógenos de diferentes espécies. Como o déficit hídrico é o principal estresse abiótico que limita a produção da soja, vários estudos visando o desenvolvimento de eventos de soja geneticamente modificada para tolerância à seca foram realizados nos últimos anos.

A superexpressão de genes de *Arabidopsis* em plantas de soja, como os fatores de transcrição *AREB1* (*Responsive Element Binding protein*) que está envolvido em respostas de estresse dependentes de ácido abscísico (ABA), foram geradas usando diferentes estratégias biotecnológicas como biolística e transformação genética. A engenharia de fatores de transcrição permite a modificação dos padrões de expressão de genes responsivos à seca e promoveu melhor crescimento e desempenho fisiológico sob déficit hídrico com maior taxa relativa de comprimento da parte aérea, condutância estomática e fotossíntese das linhagens de soja sob déficit hídrico. Além disso, as plantas geneticamente modificadas apresentaram melhor desempenho fisiológico, agrônomico e de crescimento, em comparação a cultivar convencional BR16, utilizado como *background* para a transformação (BARBOSA *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2015)

De modo similar, a introdução do fator de transcrição *DREB1A* de *A. thaliana*, cuja expressão foi dirigida pelo promotor seca-responsivo *rd29A* em embriões de soja sensíveis à seca, também se mostrou promissor. Em ensaio de seca, plantas de soja contendo a construção *rd29A AtDREB1A* apresentam níveis de expressão do fator de transcrição *AtDREB1A* superior ao observado nas plantas não submetidas ao estresse (ENGELS *et al.*, 2013; FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017). Linhagens de soja geneticamente modificadas com o gene *DREB2* foram caracterizadas quanto às respostas moleculares, fisiológicas e agronômicas e obtiveram resultados superiores comparadas a diferentes eventos e genótipos convencionais (MARINHO *et al.*, 2022).

Em ensaios a campo, também foi observado nas plantas geneticamente modificadas maior tolerância ao déficit hídrico. Neste ensaio foi possível identificar que a superexpressão do gene *AtDREB2A* em soja proporcionou aumento da expressão de diversos genes responsivos à seca, como os que codificam proteínas prolinas e desidrinas, envolvidas na osmoregulação; proteínas de choque térmico, chaperonas que protegem cadeias proteicas em condições de estresse e; proteínas aquaporinas, que formam canais condutores de água (FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017).

Outra classe de genes de interesse para modificação genética são as enzimas que estabilizam e protegem as membranas celulares chamadas de osmoprotetoras. A superexpressão do gene *AtGOLS2* em plantas de soja, levou a uma maior produção da enzima *galactinol sintase* (*GOLS*) e consequentemente maior síntese dos oligossacarídeos da família da rafinose (*RFOs*). Resultando, dessa forma, em maior tolerância e maior taxa de sobrevivência de plantas em condições de seca (HONNA *et al.*, 2016). De modo similar, a geração de plantas de soja contendo o gene *NCED3* de *Arabidopsis* (*AtNCED3*), que codifica a enzima dioxigenase 9-cis-epoxicarotenóide, essencial para a biossíntese do principal hormônio responsivo a seca, o ABA, também resultou em plantas com melhor desempenho em condições de seca (MOLINARI *et al.*, 2020).

Apesar de promissores, existem muitas implicações regulatórias para o desenvolvimento comercial dos transgênicos, portanto, atualmente se busca por alternativas para o desenvolvimento de genótipos superiores via engenharia genética. Nesse sentido, técnicas de edição de genomas podem ser uma alternativa e permite a geração de modificações genéticas de forma dirigida e pontual em qualquer região do genoma alvo. Como no Brasil, estudos serão considerados caso-a-caso e os produtos desenvolvidos via tecnologia CRISPR não serão classificados como transgênicos. O uso desta ferramenta poderá trazer vantagens em relação ao custo de desenvolvimento de produtos biotecnológicos, além de quebrar barreiras de

aceitação pública permitindo a potencialização de uso da edição gênica para geração de genótipos superiores (ENG *et al.*, 2013, BELHAJ *et al.*, 2013). Nesse contexto, se faz necessário a elucidação dos genes e suas funções a fim de prospectar alvos que possam ser utilizados na edição de genomas, como por exemplo, aqueles relacionados com o abortamento de flores e vagens durante episódios de déficit hídrico.

2.4 Processos biológicos envolvidos no abortamento de flores e vagens

As plantas de soja produzem uma grande quantidade de flores, porém, de 27% a 84% dessas estruturas reprodutivas podem ser abortadas de forma natural ou em resposta a algum estresse (ASCOUGH *et al.*, 2005; ESTORNELL *et al.*, 2013). Esse processo do desprendimento de órgãos da planta é chamado de abscisão e, é conservado em diferentes espécies como resposta a uma série de estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses abióticos, os principais são a ocorrência de temperaturas extremas e de déficit hídrico (NAVARRO *et al.*, 2002).

Quando ocorre o desprendimento de uma estrutura da planta, um dos mecanismos envolvidos é a ativação da zona de abscisão. A zona de abscisão é composta por células diferenciadas e de função especializada, posicionadas no limite entre órgãos como as folhas, flores e frutos. As células da zona de abscisão são claramente distinguíveis de suas células vizinhas, pois são menores, possuem citoplasma denso e estão interligadas por plasmodesmas. As zonas de abscisão não são ativas durante todas as fases de desenvolvimento de um órgão e a separação celular ocorre apenas quando há a ativação de enzimas hidrolases nestas regiões (ESTORNELL *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014).

Neste processo de abscisão há uma alta coordenação de mecanismos moleculares, que dinamicamente se resume em quatro etapas (ESTORNELL *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014). A primeira etapa do processo de abscisão é a diferenciação de células da zona de abscisão no local da separação entre os órgãos. A segunda etapa é caracterizada pela aquisição de competência das células receptoras de sinais de ativação da zona de abscisão, mediados principalmente pelos fitohormônios etileno e auxina. A terceira etapa corresponde ao descolamento entre os órgãos, nesta etapa, uma grande quantidade de genes codificadores de fatores de transcrição e genes que codificam enzimas da degradação da parede celular são ativados, principalmente as enzimas hidrolases. E, por fim ocorre a formação de uma camada protetora na superfície das células separadas, reduzindo a perda de água e criando uma barreira contra o ataque de

patógenos (PATTERSON *et al.*, 2001; TIWARI *et al.*, 2003; YAMAGAMI *et al.*, 2003; ELLIS *et al.*, 2005; OKUSHIMA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2011;).

O etileno desempenha um papel importante como regulador positivo da abscisão, sendo um estimulador eficaz do abortamento de órgãos vegetais devido ao aumento da sua concentração (TRANBARGER *et al.*, 2017). Além do etileno, estudos sugerem que o abortamento de flores é resultado de uma interação das vias de sinalização deste fitormônio com ABA e auxina. Em condições de seca, o ABA ativa a expressão de dois dos principais genes envolvidos na biossíntese de etileno, o gene *LLACS* (*Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase*) e o gene *LLACO* (*Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase*), resultando em acúmulo de etileno que, por sua vez, inibe o transporte da auxina. Assim, há redução do transporte de auxina para determinadas áreas vegetais, aumentando a sensibilidade destes tecidos ao etileno, o que estimula a expressão de genes associados à produção de enzimas hidrolases modificadoras de parede celular (ESTORNELL *et al.*, 2013; WILMOWICZ *et al.*, 2016).

A principal via de sinalização de abscisão envolve a ativação dos genes *IDA-HAE/HSL2*, conhecidos como o ligante peptídico *Inflorescence deficient in abscission* (*IDA*), as *Leucine-rich repeat protein* (*LRR*) *HAESA* (*HAE*) e o *HAESA-LIKE2* (JINN *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2008; STENVIK *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2019). Já as enzimas hidrolases que realizam extensa degradação da estrutura da parede celular em órgãos abortados são as poligalacturonases (GONZÁLEZ-CARRANZA *et al.*, 2002), endotransglucosilases xiloglucanas/hidrolases (XTH) (SINGH *et al.*, 2011), as β -1,4-glucanases/celulases (EGL, CEL) (DEL CAMPILLO; BENNETT, 1996) e as expansinas (EXP) (BELFIELD *et al.*, 2005; ESTORNELL *et al.*, 2013; KIM, 2014; KIM *et al.*, 2019).

Descobertas recentes no transcriptoma de tomate (XU *et al.*, 2016), *Arabidopsis* (MCKIM *et al.*, 2008) e soja (KIM *et al.*, 2019) revelaram o papel de importantes fatores de transcrição que acionam as células da camada limite na zona de abscisão e iniciam este processo. No âmbito evolutivo, a abscisão é um processo altamente vantajoso, resultando na dispersão de frutos e sementes. Em um contexto agrícola, no entanto, a abscisão pode se tornar um fator limitante para a produção das culturas, principalmente em situações de seca, por aumentar o abortamento além do nível que já ocorre naturalmente (ESTORNELL *et al.*, 2013). A elucidação de vias biológicas responsivas a seca na fase reprodutiva da soja, por meio de análise de transcriptoma de flor e vagem pode permitir o entendimento de processos relacionados a abscisão de órgãos reprodutivos. Dessa forma, a busca de genes diferencialmente expressos na fase reprodutiva da soja em bibliotecas de RNA-Seq pode elucidar funções

moleculares que possibilitem a identificação de potenciais genes para edição via tecnologia CRISPR/Cas.

2.5 Análise de dados de Transcriptomas

Nos últimos anos os transcriptomas de diversas espécies, incluindo o da soja, foram sequenciados e disponibilizados em bancos de dados com uma infinidade de informações sobre os genes. Sendo assim, as possibilidades de elucidar mecanismos de respostas à seca ficaram mais acessíveis, pois permitem conhecer em larga escala a presença e o padrão de expressão dos genes em uma determinada condição (WINGENDER *et al.*, 2000).

O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é um método capaz de anotar e quantificar transcritos de RNA. Existem várias estratégias metodológica de preparação de bibliotecas de RNA-Seq, uma delas é baseada na química Ribo-Zero. Nessa metodologia as bibliotecas resultantes fornecem dados de RNA codificante e RNA não codificante pela redução de RNA ribossômico, ampliando o acesso dos genes expressos. Os kits Ribo-Zero preparam as bibliotecas através da remoção do RNA ribossômico (rRNA) usando sondas biotinizadas que ligam seletivamente ao rRNA. O híbrido sonda-rRNA é então capturado por esferas magnéticas e removido, deixando o RNA de interesse em solução. Este processo minimiza a contaminação de rRNA e maximiza a porcentagem de mapeamento exclusivo de mRNA, e de uma grande quantidade de RNA não codificante como os RNAs intergênicos não codificadores longos (lincRNA), pequenos RNAs nucleares (snRNA) e pequenos RNAs nucleolares (snoRNA), que também atuam como reguladores de sistemas e processos biológicos (ILLUMINA, 2015).

Em geral, nas metodologias de construções de bibliotecas de RNA, uma amostra de RNA total é fragmentada e convertida em uma biblioteca de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) com adaptadores ligados a uma extremidade (*single-end sequencing*) ou a ambas extremidades das sequências (*paired-end sequencing*). As bibliotecas *single-end*, permitem ao sequenciador produzir apenas uma leitura do fragmento. Já as bibliotecas de pares de leituras (*paired-end*) produzem duas leituras para cada fragmento de cDNA, uma em cada extremidade, gerando mais informação, que é utilizada no processo de montagem do transcriptoma (BERGLUND; KIIVALAINEN; SYVANEN, 2011; MOLINARI *et al.*, 2021).

Os processos de montagem do transcriptoma consistem em limpeza dos *reads*, alinhamento, mapeamento e normalização. A normalização dos dados do sequenciamento para análises de transcriptoma é importante pois permite comparar conjuntos de dados a partir de um denominador comum e iguala os valores através de algoritmos que consideram

comprimento e profundidade das bibliotecas. Um dos índices utilizados é denominado de *transcripts per million* (TPM). Este índice considera o comprimento dos genes e a profundidade do sequenciamento da biblioteca, permitindo visualizar os níveis de expressão reais de um gene em relação a outro ou entre diferentes bibliotecas. O TPM utiliza um valor T (*Scaling factor*), que representa a soma de todos os valores de expressão de transcrição normalizada dividida por 1.000.000. Os genes diferencialmente expressos são observados em uma escala de Log₂FC (*Logarithm 2 fold change*), que é um valor calculado em logaritmo de base 2, ou seja, o valor Log₂FC 1/-1 e representa uma expressão duas vezes maior/menor de uma determinada amostra em relação a outra (CONESA et al., 2006; MOLINARI et al., 2021).

Os dados de RNA-Seq podem ser utilizadas para a prospecção de genes diferencialmente expressos associados a determinados processos metabólicos através de plataformas de bioinformática. Dessa forma, a utilização de bibliotecas de RNA-Seq pode ser aplicada para identificar genes diferencialmente expressos nos estádios reprodutivos iniciais da soja (R2 e R4), cujas plantas foram submetidas ao déficit hídrico em ambiente controlado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Prospectar genes diferencialmente expressos associados ao abortamento de flores e vagens de soja sob déficit hídrico, via bibliotecas de RNA-Seq.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do déficit hídrico nos processos fisiológicos e rendimento final de plantas de soja, nas fases iniciais do período reprodutivo (R2 – florescimento e R4 – Desenvolvimento vagem)
- Avaliar o perfil de expressão gênica em flores e vagens das cultivares contratantes EMBRAPA 48 (Tolerante) e BR16 (Sensível) sob déficit hídrico;
- Contribuir com conhecimentos das vias metabólicas de estruturas reprodutivas acionadas durante estresse por seca;
- Indicar genes-chave com expressão gênica induzida por seca no tecido flor e vagem para futuras estratégias biotecnológicas afim de promover tolerância à seca.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e condições experimentais

Para identificar os mecanismos de tolerância ao déficit hídrico presentes na fase reprodutiva da soja, o experimento de déficit hídrico controlado foi conduzido em Câmara de crescimento (ELETROLAB, São Paulo, BR) na Embrapa Soja (Londrina – Paraná). Para tal, os genótipos de soja selecionados foram BR16, considerado sensível à seca e EMBRAPA 48 considerado tolerante (OYA *et al.*, 2004). Para instalação do experimento, sementes das cultivares BR16 e EMBRAPA 48 foram tratadas com o fungicida Vitavax® Thiram 200 SC (200 g L⁻¹) e germinadas em papel de germinação, no escuro, por 4 dias, em temperatura controlada de 28 ± 1 °C e umidade relativa (HR) de 100%. Em seguida, as plântulas foram transferidas para vasos de 5 kg preenchidos com a mistura de solo fertilizado e areia na proporção 1:1. Após o transplante das plântulas, os vasos foram transferidos para Câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura (± 28 °C), fotoperíodo (13h:11h - Luz:Escuro) e umidade relativa ± 78% (HR), onde permaneceram até atingirem o estágio R2, quando as plantas foram submetidas ao estresse.

Para garantir a aplicação do estresse, a umidade gravimétrica do solo (UG) foi mantida em 30% nos vasos das plantas sob estresse, enquanto para a condição controle foi utilizada UG de 80%. O cálculo da UG foi realizado de acordo com Embrapa (1997), a partir da quantidade em massa de água, determinada pela seguinte equação:

$$U\% = 100(A-B)/B \text{ (Equação 1)}$$

Sendo:

A - peso da amostra úmida;

B - peso da amostra seca;

U% - Umidade gravimétrica.

A partir do cálculo da U%, determinada via pesagem dos vasos, definiu-se a UG de 100%, que corresponde à capacidade máxima de água que o vaso retém no substrato. A partir daí foi calculado a quantidade de água necessária para manter as plantas em capacidade de campo (UG = 80%) até a aplicação do estresse hídrico (UG = 30%), em R1, nas plantas que foram submetidas ao déficit hídrico. A ocorrência do estresse hídrico após a supressão da

irrigação foi confirmada pela condutância estomática foliar. Sendo considerado que as plantas estavam sob estresse moderado quando a condutância estomática atingiu valores menores que $0,15 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (FLEXAS; MEDRANO, 2002). Dessa forma, o déficit hídrico foi aplicado por um período de 18 dias após o início de florescimento, o que corresponde aos estádios R2 a R4. Ao final deste período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e mantidas sob condições ideais de umidade do solo, até que atingissem o estágio R8.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial 2×2 sendo 2 condições hídricas, déficit hídrico (DH) e controle (C), e 3 períodos de avaliação (Fases R2 e R4) e coleta de dados de rendimento na fase R8, com 8 repetições, totalizando 96 vasos.

4.2 Análises fisiológicas e de rendimento

Os parâmetros fisiológicos foram avaliados nos estádios reprodutivos R2 e R4 utilizando o equipamento LI-6400XT (LICOR, Lincoln, NE, USA). As leituras foram realizadas nos folíolos medianos do terceiro trifólio completamente expandidos, do ápice em relação à base, sob intensidade luminosa de aproximadamente $1.000 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As avaliações foram iniciadas entre 8 e 11 horas da manhã. As variáveis aferidas foram: taxa fotossintética líquida (A) em $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; condutância estomática (*gs* - *stomatal conductance*) em $\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; taxa de transpiração (E) em $\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; e teor de clorofila (Clor) em mg cm^{-2} .

Ao atingirem o estágio R2 também foi realizada análise do número de flores após 4, 7, 11 e 15 dias de déficit hídrico (NF4, NF7, NF11, NF15; respectivamente). Para estimar o rendimento final foram contabilizados, o número total de vagem (Ntv); o número total de sementes (Nts); peso do grão (Pg) e a massa seca da parte aérea (MS). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos, submetidos ao teste de comparações múltiplas de Tukey com $p \leq 0.05$.

4.3 Extração do RNA total

Para extração do RNA total, flores (R2) e vagens (R4) das plantas de soja sob condição controle e de déficit hídrico foram coletadas em 8 repetições biológicas. Após a coleta, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o uso. O RNA total das flores e vagens foi extraído utilizando Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY,

EUA) seguindo as especificações do fabricante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop) e a integridade do RNA foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1%). O RNA foi tratado com kit turbo DNase (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) para remover o DNA remanescente.

4.4 Análises do transcriptoma via RNA-Seq

As bibliotecas de RNA-Seq compostas por três repetições biológicas, tanto para as amostras do tratamento controle quanto de déficit hídrico, foram construídas com o Kit TruSeq® Stranded Ribo-Zero™ para plantas e sequenciadas pelo sistema NovaSeq 6000 da plataforma Illumina (ILLUMINA, San Diego, CA, EUA). O mapeamento de *reads* no genoma referência da soja (*Glycine max* Phytozome v1.1) foi realizado usando a plataforma GeneSifter. Após a montagem do transcriptoma, os dados de expressão foram normalizados com TPM utilizando um valor T com FDR < 0,05. Em seguida, os dados foram transformados em uma escala Log2FC (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010; COVRE, 2013).

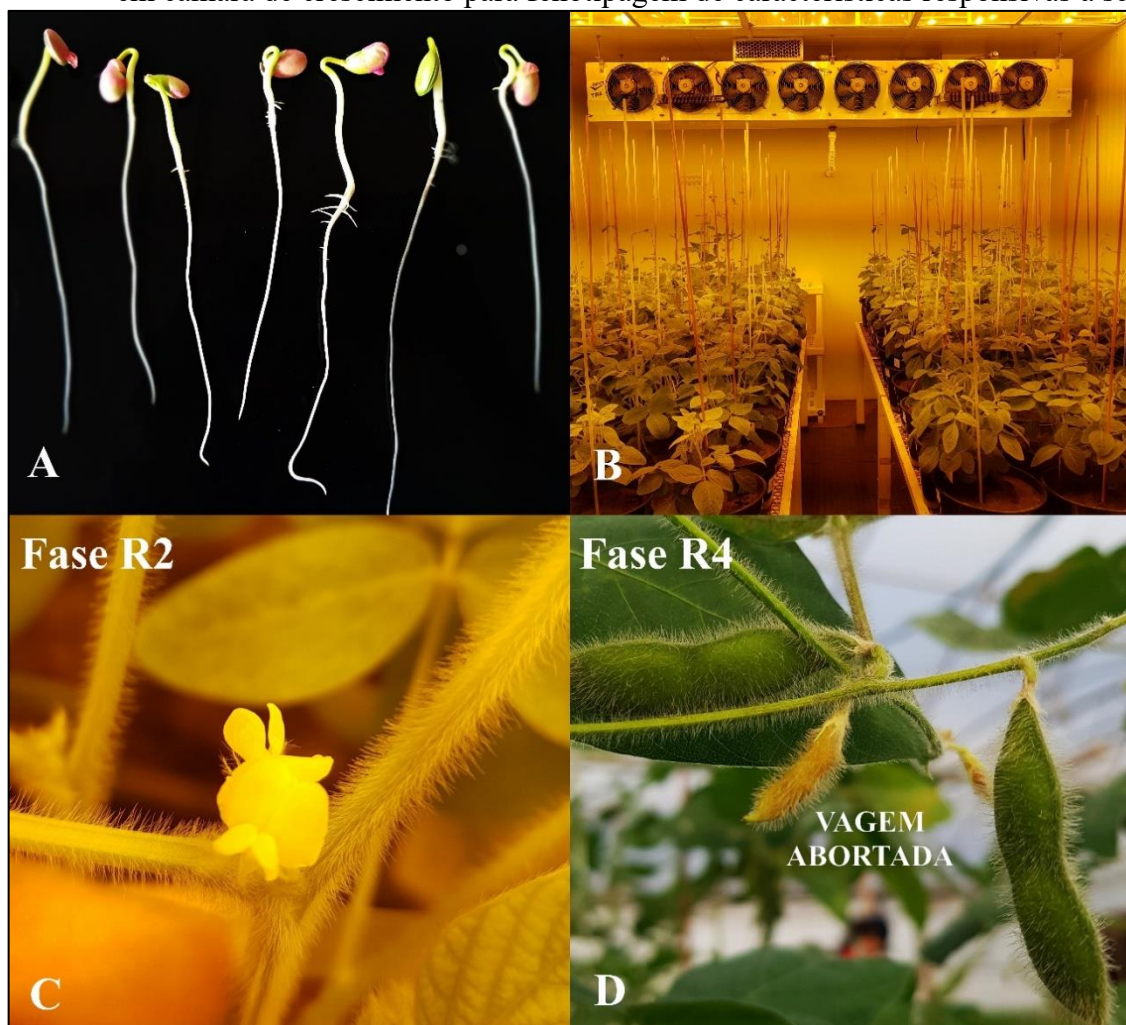
Os transcritos obtidos foram anotados funcionalmente a partir de buscas por similaridade com sequências já depositadas nos bancos de dados de sequências do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Phytozome e bancos de dados exclusivos de soja, como o Soybase e o SoyKB. O diagrama de Venn foi elaborado utilizando as ferramentas Venn diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) e InteractiVenn (HEBERLE *et al.*, 2015) para identificar os genes diferencialmente expressos de maneira exclusiva e compartilhada entre os tratamentos. Adicionalmente, buscas no banco do Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), AgriGO (DU *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2017) forneceu informações sobre vias metabólicas relacionadas aos genes candidatos diferencialmente expressos. As análises exploratórias de genes associados ao abortamento de flor e vagem foram usadas para a criação de um heatmap de expressão gênica realizada pelo *software* ClustVis (METSALU; VILO, 2015).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros fisiológicos e componentes de rendimento

O déficit hídrico (DH) foi aplicado entre a fase R2, quando as plantas apresentaram plena produção de flores, e R4 quando se observava vagens de até 2 cm (Figura 1). Para garantir que as plantas estivessem sob DH, a condutância estomática (g_s) foi monitorada, sendo considerado estresse hídrico valores de g_s abaixo de $0,15 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (FLEXAS; MEDRANO, 2002). Os valores de g_s em R2 e R4 ficaram próximos de $0,10 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, confirmando que as plantas sob DH estavam em condições de estresse hídrico moderado (Tabela1).

Figura 1 – Ensaio de déficit hídrico controlado aplicado na fase reprodutiva da soja, conduzido em câmara de crescimento para fenotipagem de características responsivas à seca.



(A) Plântulas desenvolvidas após a germinação de sementes; (B) Transplantes das plântulas para vasos e transferência para câmara de crescimento para o monitoramento da umidade gravimétrica do solo em ambiente controlado; (C) Desenvolvimento de flor sob DH para avaliação do rendimento sob DH na fase R2 ($g_s = 0,19$ controle e $0,08$ em DH); (D) Desenvolvimento de vagem sob DH para avaliação do rendimento sob DH na fase R4 ($g_s = 0,29$ controle e $0,11$ em DH). Fonte: Da autora (2022).

Além da *gs*, o DH também impactou negativamente a taxa de transpiração (E), sendo observada um valor duas vezes maior nas plantas sob condições controle, em comparação às plantas sob DH, em ambos os estádios de desenvolvimento avaliados (R2 e R4). Não houve efeito dos tratamentos hídricos sob a taxa fotossintética (A) em R2, no entanto, esta variável teve o maior impacto em R4. Nesse estágio, as plantas sob DH apresentaram diferenças de *gs* e taxa de transpiração, e redução de quase 50% na taxa fotossintética (A) em comparação com as plantas controle. Para o teor de clorofila (Clor), em ambos os estádios foi observado diferenças significativas entre genótipos, com maior teor na cultivar EMBRAPA 48 (Tabela 1).

Tabela 1 – Respostas fisiológicas das plantas de soja dos genótipos BR16 e EMBRAPA 48 com déficit hídrico (DH) e irrigada (Controle) nas fases R2 e R4.

Fatores	A	<i>gs</i>	E	Clor
R2				
Genótipo	ns	*	*	*
BR16	13,50	0,09 b	1,78 b	0,021 b
EMBRAPA 48	18,38	0,18 a	3,25 a	0,024 a
Tratamento	ns	*	*	ns
Controle	18,79	0,19 a	3,37 a	0,023
DH	13,09	0,08 b	1,67 b	0,022
Efeitos de Interação				
G x T ^z	ns	ns	ns	ns
CV (%)	28,90	60,97	54,89	13,77
DP	8,45	0,08	1,44	0,003
R4				
Genótipo	ns	ns	ns	**
BR16	18,12	0,20	3,12	0,020 b
EMBRAPA 48	16,02	0,21	3,13	0,023 a
Tratamento	***	***	***	ns
Controle	21,29 a	0,29 a	4,22 a	0,022
DH	13,41 b	0,11 b	2,03 b	0,022
Efeitos de Interação				
G x T ^z	ns	ns	ns	ns
CV (%)	23,39	43,44	33,05	14,50
DP	3,99	0,08	1,03	0,003

A - taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); *gs* - condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E - taxa de transpiração ($\mu\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); e Clor - teor de clorofila (mg cm^{-2}). Diferentes letras minúsculas indicam que as médias diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). G x T - interação entre genótipos (BR16 e EMBRAPA 48) e condição hídrica (Controle e DH); CV(%) - coeficiente de variação; DP - desvio padrão. *significativo - ANOVA ($p < 0,05$); ns – não significativo. Fonte: Da autora (2022).

Em relação aos resultados dos parâmetros fisiológicos entre os genótipos no estágio R2, BR16 e EMBRAPA 48 apresentaram parâmetros fisiológicos contrastantes, exceto pela taxa fotossintética, que não foi afetada em R2 para ambos. A condutância estomática (gs) e a taxa de transpiração (E) observadas no genótipo EMBRAPA 48, considerado tolerante, foi o dobro da registrada nas plantas do genótipo BR16, considerada sensível (Tabela 1). Enquanto, no estágio R4, apenas o teor de clorofila foi afetado pelos genótipos estudados, sendo maior nas plantas da cultivar EMBRAPA 48 em comparação às plantas da BR16. Não foi verificada interação significativa nos parâmetros fisiológicos entre os genótipos e os tratamentos para nenhuma variável fisiológica avaliada (Tabela 1).

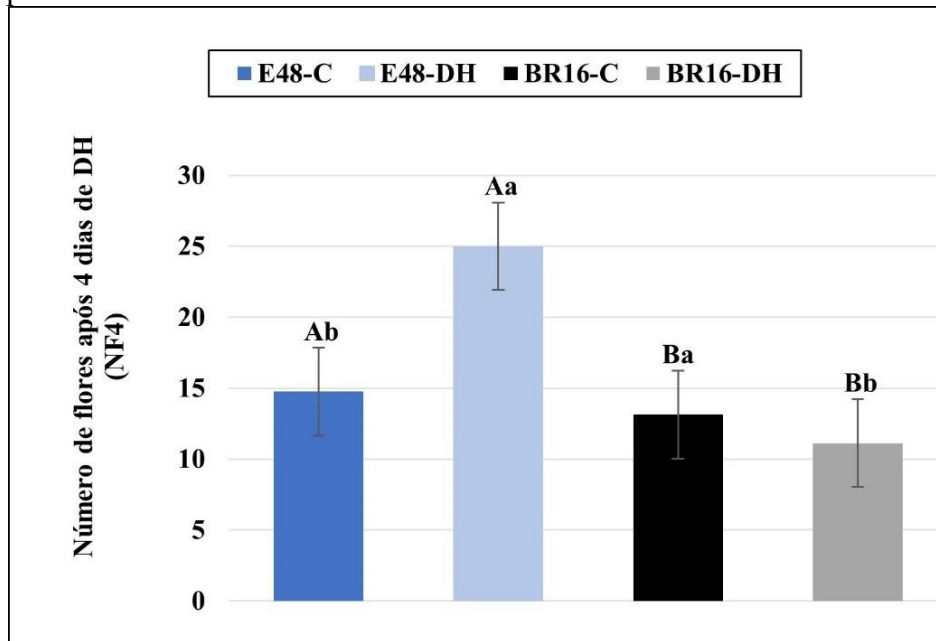
Durante o período de aplicação do DH foi monitorada nos genótipos a produção de flores em diferentes dias de duração do estresse hídrico (Tabela 2). Durante a percepção inicial do tratamento DH para o número de flores com apenas 4 dias após o início da restrição hídrica (NF4), houve interação significativa entre os genótipos e a condição hídrica, no qual, as plantas apresentaram número de flores significativamente maior em condição de DH (Figura 2). Com o avanço do período sob DH observou-se maiores diferenças entre os genótipos, onde BR16 obteve uma maior produção de flores em contraste com a cultivar EMBRAPA 48. No entanto, sob DH essas cultivares apresentaram os mesmos limites de produção de flores.

Tabela 2– Produção de flores monitoradas durante 15 dias de florescimento para os genótipos BR16 e EMBRAPA 48 em ensaio controlado de seca.

Fatores	NF4		NF7		NF11		NF15	
Genótipo	**		ns		**		***	
BR16	7,67	b	31,59		74,47	a	67,97	a
EMBRAPA 48	16,07	a	31,56		56,84	b	32,06	b
Tratamento	**		ns		ns		ns	
Controle	6,81	b	31,03		65,75		51,59	
DH	15,72	a	32,13		65,56		48,44	
Efeitos de Interação								
GxT	*		ns		ns		ns	
CV(%)	88,34		51,97		34,47		35,05	
DP	10,36		16,41		22,63		17,53	

Resultado das médias do número de flores após 4 dias de DH (NF4); número de flores após 7 dias de DH (NF7); número de flores após 11 dias de DH (NF11); e número de flores após 15 dias de DH (NF15). Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). G x T - Interações entre Genótipo x Tratamento; CV% - coeficiente de variação e DP - Desvio Padrão das variáveis testadas para as médias de 8 repetições biológicas. Fonte: Da autora (2022).

Figura 2 – Parâmetros da produção de flores e percepção inicial do déficit hídrico em BR16 e EMBRAPA 48. Após 4 dias de déficit de hídrico (NF4) com indução de floração precoce em EMBRAPA 48.



Letras minúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre condição hídrica (Controle e DH). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre genótipos (BR16 e EMBRAPA 48) para as médias de 8 repetições biológicas. NF4: Número de flores após 4 dias de Déficit Hídrico. E48-C: EMBRAPA 48 sob controle; E48-DH: EMBRAPA 48 sob déficit hídrico; BR16-C: BR16 sob controle; BR16-DH sob déficit hídrico (Fonte: Da autora (2022)).

Também não foi verificada diferenças significativas no abortamento de flores e vagens entre as cultivares testadas, uma vez que em ambos os genótipos houve reduções no número total de vagens (Ntv), número total de sementes (Nts) e peso do grão (Pg) (Tabela 3). O tratamento de DH teve efeitos no rendimento final para esses componentes em ambos os genótipos. No entanto, não foi observado interação significativa entre genótipo x tratamento nessas variáveis testadas.

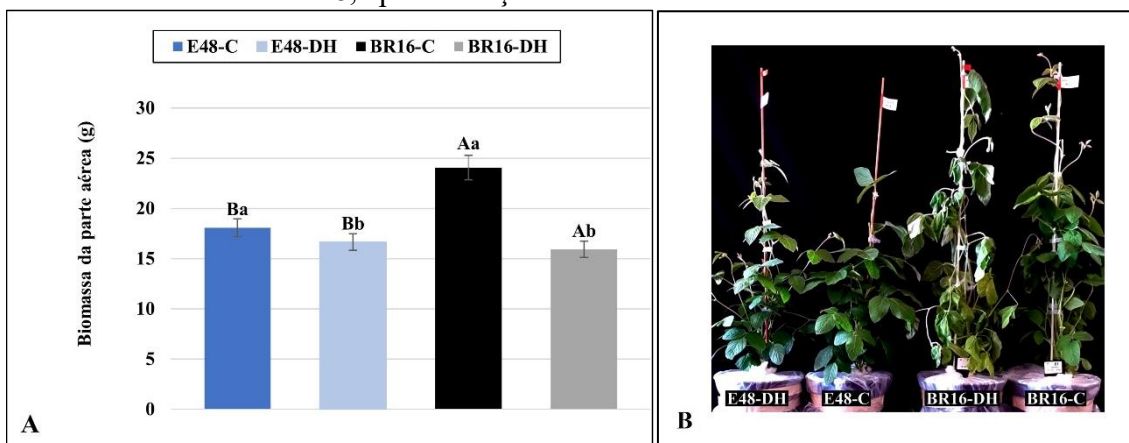
Tabela 3 – Resultados do rendimento final na fase R8 de soja após déficit hídrico no estágio de desenvolvimento R2-R4 entre os genótipos BR16 e EMBRAPA 48.

Fatores	Ntv	Nts	Pg	
Genótipo	ns	ns	*	
BR16	71,59	133,09	25,48	b
EMBRAPA 48	72,12	133,76	26,13	a
Tratamento	*	*	*	
Controle	82,90	a	156,37	a
DH	60,81	b	110,48	b
Efeitos de Interação				
G x T	ns	ns	ns	
CV (%)	11,55	10,63	10,77	
DP	8,30	14,18	2,78	

Ntv - número total de vagem; Nts - número total de sementes; Pg - peso do grão. Letras minúsculas diferentes, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). G x T - Interações entre Genótipo x Tratamento; CV% - coeficiente de variação e DP - Desvio Padrão das variáveis testadas para as médias de 8 repetições biológicas. Fonte: Da autora (2022).

Foram observadas interações significativas entre os genótipos e tratamentos avaliados em relação à produção de biomassa da parte aérea, no qual, observou maior impacto no desenvolvimento de biomassa na cultivar sensível à seca (BR16) com perdas chegando a 33,87% em situações de seca. Já o genótipo EMBRAPA 48 apresentou redução de 7,89% em situações com escassez de água em influência a percepção inicial de estresse hídrico (Figura 3).

Figura 3 – Biomassa sob déficit hídrico em estruturas aéreas nas cultivares de soja BR16 e EMBRAPA 48, após restrição hídrica no estágio de desenvolvimento R2-R4.



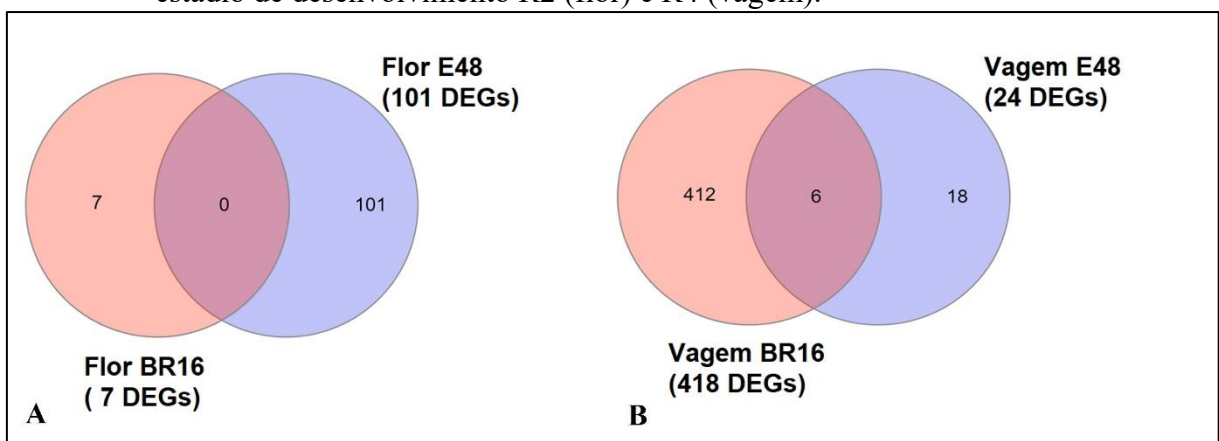
(A) Parâmetros da biomassa sob DH em estruturas aéreas nas cultivares BR16 e EMBRAPA 48, após restrição hídrica no estágio de desenvolvimento R2-R4. Letras minúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) entre condição hídrica (Controle e DH) e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os genótipos (BR16 e EMBRAPA 48) para as médias de 8 repetições biológicas. E48-C: EMBRAPA 48 sob controle; E48-DH: EMBRAPA 48 sob déficit hídrico; BR16-C: BR16 sob controle; BR16-DH sob déficit hídrico (B) Genótipos EMBRAPA 48 e BR16 durante o ensaio de DH na fase reprodutiva e respostas fenotípicas como aumento de murcha e clorose em BR16-DH na parte aérea induzidas por seca. Fonte: Da autora (2022).

5.2 Resultados da expressão gênica de flor e vagem via RNA – Seq

Com os resultados obtidos da análise de RNA-Seq referente às amostras de flores e vagens das cultivares BR16 e EMBRAPA 48, foi possível identificar 544 genes diferencialmente expressos (DEGs) nos tecidos de flor e vagem em função do DH. Considerando os genótipos, no tecido de flor da cultivar EMBRAPA 48 (F-48) foram identificados 101 DEGs, dos quais 91 genes estavam *upregulated* e 10 *downregulated*. No genótipo BR16, foram identificados 7 DEGs na flor do genótipo BR16 (F-BR16), dos quais foram observados 6 genes regulados para cima (*upregulated*) e 1 gene regulado para baixo (*downregulated*) (Figura 4A e 4B). Em relação à vagem, foram identificados 418 DEGs no genótipo BR16 (V-BR16), dos quais 167 estavam *upregulated* e 251 *downregulated*, enquanto nas vagens do genótipo EMBRAPA 48 (V-EMBRAPA 48) foram identificados 24 DEGs, dos quais 9 estavam *upregulated* e 15 *downregulated*.

No estágio R2, o DH proporcionou um maior número de genes expressos em flores no genótipo EMBRAPA 48, onde a maioria desses genes apresentaram perfil upregulados sob seca. Quando o DH foi prolongado na fase R4, o genótipo que apresentou maior alteração na expressão dos genes em BR16, com genes parcialmente upregulados e outros genes com perfil downregulados.

Figura 4 – Genes diferencialmente expressos nas cultivares BR16 e EMBRAPA 48 induzidos pelo déficit hídrico comparados à condição controle, em tecidos específicos no estágio de desenvolvimento R2 (flor) e R4 (vagem).



(A) Total de DEGs, grupos gênicos exclusivos e compartilhados entre a cultivar BR16 (vermelho) e EMBRAPA 48 (roxo) para o tecido-específico flor usando o diagrama de Venn; (B) Total de DEGs, grupos gênicos exclusivos e compartilhados entre a cultivar BR16 (vermelho) e EMBRAPA 48 (roxo) para o tecido-específico vagem usando o diagrama de Venn. Fonte: Da autora (2022).

Em relação aos resultados de enriquecimento via análises GO (*Gene ontology*), os DEGs desses tecidos, mostraram-se estarem envolvidos em processos metabólicos primário, regulação do processo celular, ligação de DNA, transcrição e tradução do RNA, processo metabólico do nitrogênio, resposta molecular ao estímulo, ligação da cromatina, regulação negativa da atividade catalítica como também o enriquecimento da atividade do reservatório de nutrientes (Tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização ontológica dos processos biológicos detectados a partir do conjunto de dados de RNA-Seq em flor e vagem sob déficit hídrico.

GO	P-value 0,05	Tecido- Alvo	Descrição
GO:0044238	0,0079	BR16-V	Processo metabólico primário
GO:0050794	0,0019	BR16-V	Regulação do processo celular
GO:0003677	0,00077	BR16-V	Ligação de DNA
GO:0051252	4.4e-05	BR16-V	Regulação do processo metabólico de RNA
GO:0006355	4.4e-05	BR16-V	Regulação da transcrição, dependente de DNA
GO:0019219	5.2e-05	BR16-V	Regulação do processo metabólico ácido nucleico
GO:0051171	5.2e-05	BR16-V	Regulação do processo metabólico do composto de nitrogênio
GO:0031326	5.5e-05	BR16-V	Regulação do processo biossintético celular
GO:0010468	7.8e-05	BR16-V	Regulação da expressão gênica
GO:0050896	0,027	BR16-V	Resposta ao estímulo
GO:0003682	0,042	E48-V	Ligação da cromatina
GO:0043086	0,043	E48-F	Regulação negativa da atividade catalítica
GO:0045735	0,04	E48-F	Atividade do reservatório de nutrientes

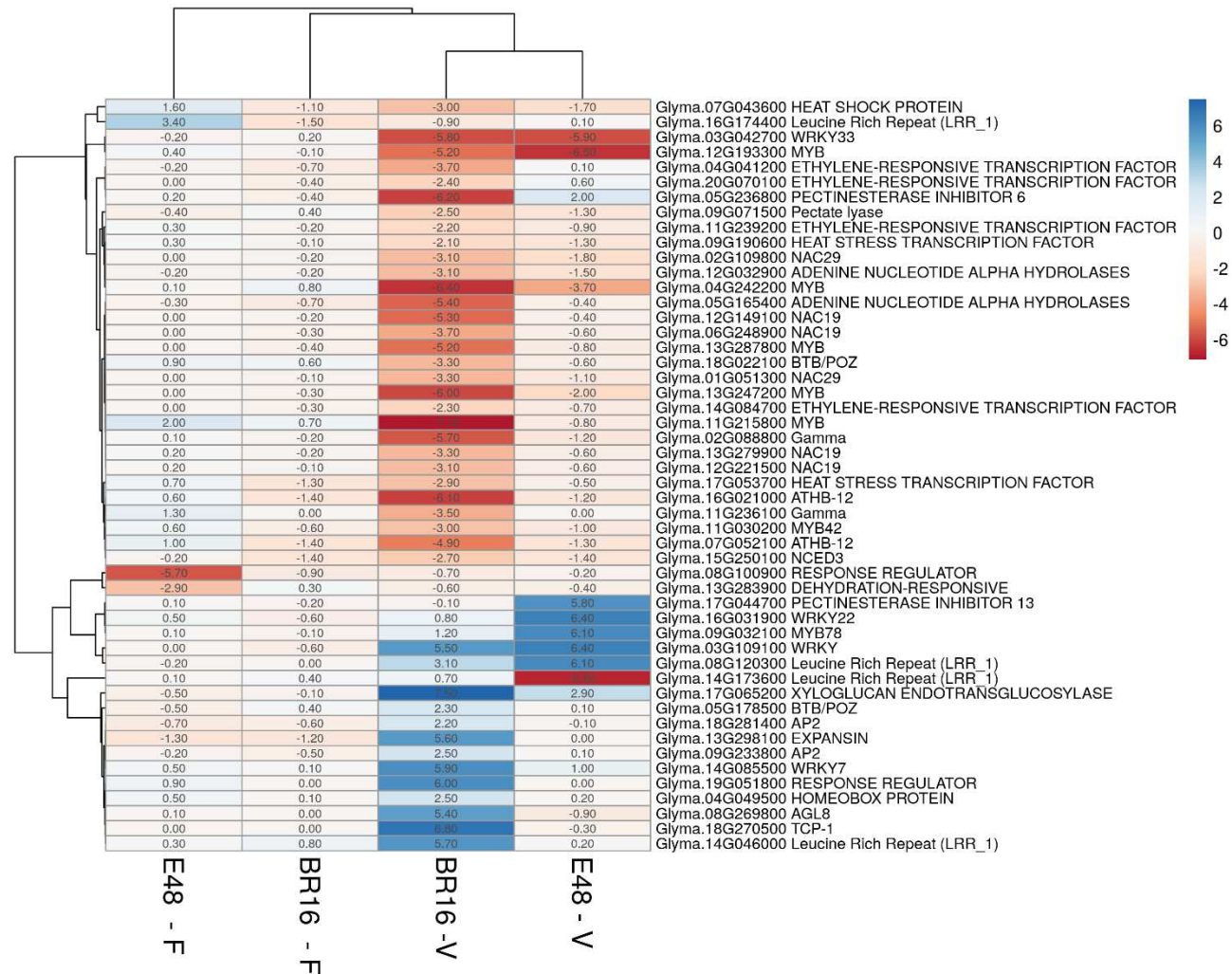
O valor de P-value de cada termo GO (Ontologia gênica) representa a significância do enriquecimento dos genes diferencialmente expresso obtidos para o tecido flor e vagem dos genótipos BR16 e EMBRAPA 48. BR16-F: Flor de BR16; BR16-V: Vagem de BR16; E48-F: Flor de EMBRAPA 48; E48-V: Vagem de EMBRAPA 48. Fonte: Da autora (2022).

Os genes mais enriquecidos encontrados na biblioteca de RNA-Seq correspondem a um grupo de genes codificadores de fatores de transcrição que são proteínas responsáveis pelo controle da expressão gênica capaz de se ligarem diretamente ao DNA. Entre os fatores de transcrição, foram identificados membros das famílias gênicas WRKY, MYB, NAC e genes LRR. A presença de genes multiestresse responsivos a codificadores de proteínas *heat shock* (chaperonas) (Glyma.19G051800; Glyma.09G190600; Glyma.17G053700; Glyma.07G043600; Glyma.08G100900). No entanto, mesmo tendo a mesma função, esse grupo de genes apresentou comportamentos diferentes em tecidos específicos. O Glyma.09G190600; Glyma.17G053700 e Glyma.07G043600 foram downregulados e o gene Glyma.19G051800 upregulado para vagem de BR16, já o gene Glyma.08G100900 teve perfil downregulado em flores de EMBRAPA 48 (Figura 5).

Foram detectados a presença de genes envolvendo o fitohormônio etileno e ABA como fatores de transcrição responsivo ao etileno e gene codificador da enzima NCED (*9- cis - epoxycarotenoide dioxigenase*) como o Glyma.11G239200, Glyma.14G084700, Glyma.04G041200, Glyma.20G070100 e Glyma.15G250100. Todos esses genes apresentaram perfil downregulado no tecido vagem. Também foi possível mensurar a expressão de genes associados ao florescimento, como os genes Glyma.18G281400 e Glyma.09G233800 AP2 (Upregulados), Glyma.18G022100 e Glyma.05G178500 BTB/POZ (Up/Downregulados), Glyma.18G270500 TCP1 (Upregulados). Esses genes foram presentes de forma *up* e/ou *down* (Figura 5).

Foram detectados na biblioteca analisada vários genes codificadores de enzimas hidrolases importantes no abortamento de estruturas reprodutivas, sendo essas, genes codificadores das enzimas *gamma* (Glyma.11G236100), *pectate lyase* (Glyma.09G071500), *xyloglucan endotransglucosylase* (Glyma.17G065200), *adenine nucleotide alpha hydrolases* (Glyma.12G032900; Glyma.05G165400), *pectinesterase inhibitor 6* (Glyma.05G236800), *expansin* (Glyma.13G298100) e *pectinesterase inhibitor 13* (Glyma.17G044700) (Figura 5).

Figura 5 – Heatmap de expressão gênica via RNA-Seq em soja e prospecção de genes candidatos ao abortamento de estruturas reprodutivas e genes responsivos ao estresse hídrico.



Genes regulados para cima (*Upregulated* >2 Log2FC *P-value* 0,05 em azul) e para baixo (*Downregulated* <2 Log2FC *P-value* 0,05 em vermelho) para flor e vagem nas cultivares BR16 e EMBRAPA 48 submetidas à condição de déficit hídrico. Os genes que não estão dentro desses valores não foram significativos. BR16-F: Flor de BR16; BR16-V: Vagem de BR16; E48-F: Flor de EMBRAPA 48; E48-V: Vagem de EMBRAPA 48. Fonte: Da autora (2022).

Foram identificados 6 DEGs presentes no tecido de vagem para ambos os genótipos avaliados (BR16 e EMBRAPA 48) com o mesmo perfil de expressão gênica sob DH, revelando a alta conservação desses genes responsivos à seca na fase reprodutiva. Entre os genes *upregulated* foi identificado *Glycine rich protein family – GRP* (Glyma.14G052000), o fator de transcrição *WRKY33* (Glyma.03G109100) e *LRR receptor-like serine/threonine RFK1* (Glyma.08G120300). E, entre os DEGs *downsregulated* foram identificados os genes *Aquaporin transporter – AQPs* (Glyma.11G143100), *Serine carboxypeptidase-like 31* (Glyma.13G183700) e o Glyma.12G237600, sem anotação até o presente momento (Tabela 5).

Tabela 5 – Genes compartilhados e diferencialmente expressos nos genótipos BR16 e EMBRAPA 48 sob seca e perfil de expressão gênica em Log2FC com a respectiva anotação molecular.

DEGs em Comum	Log2FC BR16	Log2FC EMBRAPA 48	Perfil de expressão	Anotação
Glyma.14G052000	2,56	2,55	<i>Upregulated</i>	<i>GRP</i>
Glyma.11G143100	-2,47	-2,65	<i>Downregulated</i>	<i>AQUAPORIN TRANSPORTER</i>
Glyma.12G237600	-2,19	-2,72	<i>Downregulated</i>	<i>NO DESCRIPTION</i>
Glyma.13G183700	-6,66	-7,06	<i>Downregulated</i>	<i>SERINE CARBOXYPEPTIDASE</i>
Glyma.03G109100	5,48	6,35	<i>Upregulated</i>	<i>WRKY</i>
Glyma.08G120300	3,14	6,06	<i>Upregulated</i>	<i>RFK1</i>

Fonte: Da autora (2022).

6 DISCUSSÃO

6.1 Parâmetros fisiológicos nas fases R2 e R4 sob déficit hídrico

Durante as avaliações fisiológicas, os genótipos BR16 e EMBRAPA 48 sob tratamento de seca estavam em diferentes durações de DH. Na fase R2, foi aplicado estresse de curta duração, no qual as plantas foram avaliadas com 4 dias de restrição hídrica. E na fase R4, o estresse hídrico foi de longa duração, com um período de 18 dias em DH. Nessas situações de imposição de DH, sabe-se que a soja é capaz de desenvolver mecanismos de aclimação por meio do desencadeamento de respostas fisiológicas e modulações moleculares para tolerar às condições adversas de seca. No entanto, as respostas obtidas no presente trabalho foram dependentes de uma complexa interação seja do tempo de duração, época de ocorrência e severidade do déficit hídrico, além das características dos genótipos, diferentes tecidos e do estágio de desenvolvimento fenológico que o tratamento de seca foi imposto (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003).

Em relação às respostas fisiológicas entre os genótipos BR16 e EMBRAPA 48, foi detectado diferenças na condutância estomática (g_s) e na taxa de transpiração (E) na fase R2 (Tabela 1). Observamos no genótipo EMBRAPA 48, considerado tolerante, o dobro de valores da condutância estomática (g_s) e taxa de transpiração (E) comparadas com o genótipo BR16, considerada sensível, porém sem interações $G \times T$ significativas. Quando as plantas são submetidas a estresses de curta duração, a principal resposta fisiológica dos genótipos é acionar processos biológicos de evapotranspiração como mecanismo de adaptação ao estresse, a fim de reduzir perdas de água (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Pode-se observar nos parâmetros fisiológicos avaliados em R2, que os dois genótipos diminuíram a condutância estomática (g_s) no tratamento de DH. Este parâmetro pode ser associado a eficiência no uso da água em cada genótipo, regulando a perda de água e as trocas gasosas realizadas com o ambiente através dos estômatos. Esta corresponde a uma das primeiras respostas fisiológicas precoces contra o DH para diminuir a g_s e E para minimizar a perda de água e por consequência, também limita a difusão de CO_2 para os cloroplastos. Sendo assim, caso o DH for intensificado pode acarretar efeitos drásticos no processo fotossintético. Além disso, pode ocorrer a diminuição de g_s e E com o objetivo de manter a água no interior celular em percepção de escassez no ambiente, tornando menor a intensificação do processo de evapotranspiração (CHAVES, FLEXAS E PINHEIRO., 2009)

O declínio da condutância estomática, mesmo que de forma moderada, pode incrementar a tolerância ao DH por acionar uma melhor eficiência de uso da água disponível no solo (SIRICHANDRA *et al.*, 2009). Diversos trabalhos relataram que a maior conservação de água no solo pode decorrer do declínio precoce da taxa de transpiração, permitindo que ocorra maior conservação da água nesse substrato a partir da menor perda de água para o ambiente ao longo dos dias (RAY; SINCLAIR, 1998; VADEZ; SINCLAIR, 2001).

Nossos resultados elucidaram que os genótipos de soja EMBRAPA 48 e BR16 ao perceber o DH, adotam a estratégia conhecida como evitamento à seca por meio da diminuição da condutância estomática, principalmente com o intuito de diminuir a perda de água para o ambiente, conservando-a no espaço celular (SIRICHANDRA *et al.*, 2009; LAWLOR, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013). Evitamento é um dos principais mecanismos conferidos pelas plantas a fim de conservar níveis altos de água nos tecidos vegetais durante períodos de estresse, seja pela maior eficiência na absorção de água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. A tolerância à seca permite à planta manter seu turgor e continuar seu metabolismo mesmo em condições de baixo potencial hídrico. Tal estratégia é alcançada pela síntese de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis que asseguram o turgor entre os meios extracelulares e intracelulares (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997; FANG; XIONG, 2015).

No experimento, os parâmetros fisiológicos também foram avaliados em estágio R4, quando se observava vagens de até 2 cm, em pleno crescimento e início do desenvolvimento de sementes. Nessa fase, o DH foi intensificado para 18 dias, considerado de longa duração e causou uma maior intensidade dos valores de condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e também da taxa fotossintética (A) (Tabela 1). Esta progressão do DH chegou a causar redução de até 50% no processo fotossintético para os dois genótipos testados. Em razão do fechamento estomático, a fotossíntese foi o alvo chave atingido dentro da cascata de processos biológicos em resposta à seca, principalmente por consequências na redução da difusão de CO_2 nos cloroplastos. Uma das capacidades de adaptação das plantas em diferentes ambientes está relacionada com a sua habilidade de adaptação fotossintética, podendo ser prejudicada via regulação de mecanismos fisiológicos e moleculares, e afetar diretamente o rendimento final nos grãos (CHAVES, 1991; SIRICHANDRA *et al.*, 2009; ANJUM *et al.*, 2011; TUBEROSA, 2012).

6.2 Parâmetros de produção de flores sob déficit hídrico

Quando observamos os fenótipos variados durante o DH em R2, foi detectado interação significativa entre os genótipos e a condição hídrica para o número de flores com 4 dias após o início da restrição hídrica (NF4), no qual o genótipo EMBRAPA 48 apresentou floração precoce em condição de DH (Figura 2). Essa resposta pode estar associada a estratégia de escape do genótipo EMBRAPA 48 sob seca, o escape é a ativação da aceleração do ciclo como mecanismo de adaptação a situações ambientais para garantir a produção de vagens e sementes (HEATHERLY; ELMORE, 2004).

O comportamento da cultivar BR16 no que tange a produção de flores convertidas em vagem, manteve uma produção crescente conforme quantificação observada, com picos de contagem de flores acima de uma média de 74 flores sob DH e conversão de 71 vagens (Tabela 2). Para a cultivar EMBRAPA 48 foi observado a conversão maior do que o quantificado sob DH, com pico de contagem de 51 flores e conversão de 72 vagens (Tabela 2). O genótipo BR16 obteve uma maior produção de flores em contraste com a cultivar EMBRAPA 48 sugerindo que EMBRAPA 48 tenha acionado a conversão de vagens de forma mais precoce, enquanto BR16 manteve a emissão de flores de forma crescente durante o DH imposto.

O termo escape à seca refere-se a uma capacidade natural ou induzida de ajustar o crescimento e desenvolvimento da planta visando evitar a estação ou os períodos de seca prolongado, resultando em crescimento e florescimento precoces, podendo acarretar diminuição do número de vagens e sementes, pelo desequilíbrio energético e nutricional. A floração precoce é um mecanismo de fuga adotado pelas plantas para garantir sobrevivência em ambientes hostis, é seguida por senescência e abortamento de flores. As plantas priorizam o abortamento de flores jovens e concentram-se em flores maduras para permitir que terminem seu desenvolvimento (HEATHERLY; ELMORE, 2004; WITCOMBE *et al.*, 2008; LUO, 2010; SU *et al.*, 2013; FANG; XIONG, 2015).

Essa estratégia metabólica tem como importância ajustar o desequilíbrio energético provocado pelo ambiente, e fornecer água e nutrientes para o concentrá-los em flores maduras em pleno desenvolvimento em detrimento do desenvolvimento de flores tardias. Com isso, não serão alocados nutrientes para todos os órgãos jovens que demandariam maiores gastos energéticos para a planta (HEATHERLY e ELMORE, 2004; WITCOMBE *et al.*, 2008; LUO, 2010; SU *et al.*, 2013; FANG; XIONG, 2015)

6.3 Parâmetros dos componentes de rendimento

Evidenciamos que ambos os genótipos, tiveram efeitos limitantes para a característica de conversão de flores em vagens como consequências dos efeitos significativos do tratamento de seca, uma vez que sob DH essas cultivares apresentaram os mesmos limites de produção de vagem. Esse impacto gerou perdas acima de 25% no abortamento sob o número total de vagens, conforme os resultados analisados nas condições irrigadas e déficit hídrico em ambos genótipos (Tabela 3).

Os componentes de rendimento final, no entanto, foram significativos para efeitos do tratamento seca em ambos os genótipos testados (BR16 e EMBRAPA 48), acarretando redução na produção do número total de vagens, número total de sementes e peso dos grãos sem efeitos de interação G x T (Tabela 3). Ao observar a performance dos genótipos no mesmo tratamento de seca, as plantas de soja BR16 apresentaram redução de 2,97% no total de vagem (Ntv), 7,3% total de sementes (Nts) e 8,1% no peso dos grãos (Pg), em comparação às plantas da cultivar EMBRAPA 48. Simulando um ambiente escasso em irrigação para os dois genótipos, BR16 respondeu com menor estabilidade de produção (Tabela 3).

Na fase reprodutiva ocorre o maior direcionamento de fotoassimilados na planta para os tecidos reprodutivos como vagens e sementes, a fim de garantir a reprodução e o rendimento nos grãos com uma maior concentração de produção de massa seca nesses tecidos. O estresse hídrico foi drástico durante o período reprodutivo e afetou o rendimento de grãos de forma irreversível com perdas em quantidades e peso das sementes, uma vez que, na fase reprodutiva a soja apresenta um consumo médio de água de 7,3 mm/dia para seu desenvolvimento completo, sendo considerada uma fase crítica com relação a falta de água para o desenvolvimento completo (NEUMAIER *et al.*, 2000).

Os resultados gerados elucidaram as consequências do estresse hídrico no estabelecimento da redução dos componentes do rendimento, como abortamento de vagens, redução no número de sementes e peso do grão. O impacto negativo fotossintético durante a fase R4 pode proporcionar a redução na produção de fotoassimilados em estruturas da planta como vagens e sementes, conforme pode ser verificado nos dados de rendimento obtidos (Tabela 3).

6.4 Parâmetros da produção de biomassa durante a fase reprodutiva

Os dados apresentaram interações significativas na produção de biomassa da parte aérea para os genótipos BR16 e EMBRAPA 48. A massa seca de EMBRAPA 48 mostrou-se mais estável (conservada) em comparação ao seu tratamento controle. Em contraste, BR16 apresentou perdas em massa seca de forma mais acentuada, mostrando-se mais instável sob seca (Figura 3A). Essa redução chegou a 33,87% em situações de seca no desenvolvimento de matéria seca da parte aérea de BR16. Para o genótipo EMBRAPA 48, foi obtido redução de 7,89% em situações com escassez de água.

Nosso experimento gerou diferenças no processo de reservas de fotoassimilados também manifestados sob o fenótipo biomassa entre genótipos de soja durante o estresse hídrico na fase reprodutiva. Interações significativas demonstraram que o genótipo EMBRAPA 48 mantém maior estabilidade de biomassa sob DH, enquanto o genótipo BR16 é geneticamente condicionado ao maior uso da matéria seca de partes aéreas da planta resultando em um genótipo mais instável na seca com maior redução da matéria seca em situações de priorização do realocamento de fotoassimilados aos tecidos reprodutivos.

Desde a fase R2, a soja inicia rápida e constante acumulação de matéria seca e de nutrientes na planta inteira. Inicialmente, esse acúmulo acontece nos órgãos vegetativos da planta e então este trajeto é reconfigurado aos órgãos reprodutivos à medida que inicia o florescimento. Em condições climáticas escassas, ocorre a limitação de transporte de nutrientes para diferentes tecidos e órgãos vegetais, com a priorização do transporte de fotoassimilados para vagens e sementes, e na fase reprodutiva, essa priorização é ainda mais acentuada (NILCOLAS *et al.*, 1985; NEUMAIER *et al.*, 2000). Sugere-se que em situação de déficit hídrico a maior reserva de matéria seca na parte aérea total da planta possa garantir uma maior eficiência de realocamento de fotoassimilados durante a fase reprodutiva para concentrá-la em estruturas como vagens e grãos durante seu desenvolvimento inicial até seu desenvolvimento pleno. **Podendo ser consequência de um melhor desempenho fisiológico relacionado aos menores impactos em *gs*, *E* e *A* em cultivares tolerantes como EMBRAPA48 sob DH.**

6.5 Parâmetros da expressão gênica na flor e vagem e respectivas vias biológicas

A regulação da expressão gênica envolve mudanças nos níveis dos transcritos de determinados genes funcionais como forma de respostas das plantas a estímulos externos, como estresse ocasionado por déficit hídrico (HUANG *et al.*, 2015). Durante a imposição do estresse

hídrico analisamos a expressão gênica para elucidar a base molecular de características complexas como a resposta de tolerância à seca.

Foram obtidas variações na expressão gênica nos tecidos flor e vagem para 544 DEGs em resposta à seca, dos quais 108 genes foram significativos em flores (Figura 4A). Os resultados mostraram 101 DEGs (10 genes *Down* e 91 *Up*) expressos no genótipo EMBRAPA 48, representando o conjunto de genes expressos nas flores sob DH, e 7 DEGs em flores do genótipo BR16 (1 gene *Down* e 6 genes *Up*). Segundo o trabalhado realizado por Molinari *et al.* (2021), foi obtido um total de 225 DEGs em flores de BR16 sob seca, no qual 163 e 62 DEGs foram regulados para baixo e para cima, respectivamente. Os autores sugerem que em flores de BR16 sob as condições de seca aplicada ocorreu uma tendência em inibir a expressão gênica, sendo mais sensível à falta de água.

Em nossos resultados, tivemos uma resposta contrária, onde observamos um maior número de genes upregulados no tecido flor porém no genótipo EMBRAPA 48 sob seca, dando indícios de que há uma maior ativação de genes em resposta à falta de água na fase R2, por ser cultivar caracterizado como tolerante ao DH. O tratamento de DH nesta fase foi de curta duração, com 4 dias de DH em plena produção de flores, onde ocasionou fortes impactos nas respostas evapotranspirativas e escape de produção de flores, fornecendo uma alteração morfofisiológica para as alterações genéticas na flor com a ativação de genes desse tecido em percepção de curta duração em resposta a seca (Tabela 1, Tabela 2 e Figura 2).

Os processos biológicos afetados em resposta à seca no tecido flor, enriqueceram a regulação negativa da atividade catalítica e atividade do reservatório de nutrientes (Tabela 5). Esses processos biológicos evidenciam que há o detrimento de produção de transcritos associados aos processos catabólicos de efeitos de regulação gênica negativa da geração de energia como o processo de fotossíntese, que utiliza de quebra de fontes glicídicas e implica em problemas metabólicos para a produção de nutrientes e energia sob condições de seca (ANJUM *et al.*, 2011; CHAVES, 1991; SIRICHANDRA *et al.*, 2009; TUBEROSA, 2012).

No milho, Boyer *et al.* (2004) descobriram que o desenvolvimento de flores foi sensível à limitação da água, especialmente durante as fases iniciais, ovários e pólen foram afetados devido à inibição da atividade da invertase e do transporte de açúcar devido ao baixo potencial hídrico (BOYER; WESTGATE, 2004; MÄKELÄ *et al.*, 2005; MCLAUGHLIN; BOYER, 2004). Em nosso experimento há indícios que tecidos como flor em condição de seca há o estímulo à repressão de genes associados ao metabolismo de produção de energia, com baixa expressão de genes relacionados às quebras de moléculas fontes de reservas energéticas.

Para o tecido vagem foram identificados 418 DEGs exclusivamente em BR16 (251 genes *Down* e 167 *Up*) e 24 genes em EMBRAPA 48 (15 *Down* e 9 *Up*) (Figura 4B). No trabalho realizado com RNA-Seq de BR16, Molinari *et al.* (2021) obtiveram 140 DEGs no tecido vagem, com 23 genes regulados para baixo e 117 genes regulados para cima. Nos dados obtidos no presente estudo, também foram encontrados mais genes em downregulação no tecido vagem, no qual o tratamento de DH imposto, levou a maior inibição da expressão gênica e repressão de várias vias metabólicas.

Os resultados em relação ao conjunto de genes em vagem apresentaram alteração da transcrição de genes associados aos processos metabólicos primários que desempenham uma função essencial no vegetal como um todo, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos (Tabela 5). Corroborando com os dados dos parâmetros fisiológicos durante a fase R4 devido ao impacto em processos associados a fotossíntese (Tabela 1), onde a regulação do transporte de açúcares e outros osmólitos em resposta à seca são reduzidos com a intensificação de um estresse hídrico prolongado (CHAVES, 1991; SIRICHANDRA *et al.*, 2009; ANJUM *et al.*, 2011; TUBEROSA, 2012).

Os genes expressos no tecido vagem enriqueceram processos biológicos envolvidos nas codificações de proteínas de ligações de DNA, transcrição e tradução do RNA. Esses genes foram expressos com alta demanda para que a maquinaria molecular garanta a modulação da expressão gênica no desenvolvimento da soja sob à seca, assim, a célula torna-se capaz de regular a abundância transcricional e pós-transcricional para a modulação de atividade fisiológica visando aclimatação a condição de escassez de água (XIONG *et al.*, 2002; TUTEJA; SOPORY, 2008; CHAE *et al.*, 2009).

Segundo Molinari *et al.* (2021), os genes e vias biológicas modulados no tecido vagem do genótipo BR16 sob seca indicam que a maquinaria molecular é ativada para melhorar a sobrevivência e formação de vagens, como estratégia para preservar e transmitir material genético para a próxima geração, mesmo que isso acarrete em perdas de rendimento na produção final de vagens e sementes, semelhantes aos nossos resultados.

6.6 Genes de ativação da zona de abscisão induzidos pela seca

Foi construído um heatmap de expressão gênica com genes ortólogos envolvidos nos processos de ativação da zona de abscisão e responsivos à seca prospectados na biblioteca de RNA-Seq analisada comparadas com estudos em *Arabidopsis*, tomate entre outras. Foram selecionados principalmente fatores de transcrição e enzimas ativadoras de processos de

modelação da parede celular. Patterson *et al.* (2001) exploraram a estratégia do uso de sistemas de abscisão de órgãos em plantas modelo, como o tomate e a *Arabidopsis*, pois podem fornecer aplicações para alterar a abscisão em grandes culturas. Os autores destacam que essa estratégia pode permitir uma compreensão do desenvolvimento único de cada espécie, bem como dos genes alvo ou vias de interesse no processo de abscisão de órgãos.

Entre os fatores de transcrição foram prospectados os genes membros das famílias gênicas LRR ricos em regiões de leucinas receptoras de quinases (AP2, BTB/POZ, TCP1, WRKY, MYB, NAC) (Figura 5). As mudanças na expressão gênica sob a seca nesses genes são importantes por serem fatores de transcrição, pois a regulação transcricional é a principal resposta à seca durante a fase reprodutiva também identificadas em RNA-Seq de *Arabidopsis* (SU *et al.*, 2013).

Em soja, uma análise de RNA-Seq identificou genes regulados diferencialmente na zona de abscisão foliar. A análise de redes revelou que a maioria dos genes expressos eram fatores de transcrição relacionados a abscisão e estavam ligados a processos biológicos de crescimento lateral, diferenciação celular e ao desenvolvimento de células especializadas de órgãos vegetais (KIM *et al.*, 2015). Este mesmo estudo revelou redes reguladoras de transcrição composta de 188 TFs específicos de abscisão em folhas de soja contendo domínios para homeobox, MYB, Zinc finger, bHLH, AP2, NAC, WRKY, YABBY, TCP1 e BTB/POZ. Segundo Kim *et al.* (2015), esses transcritos acumulados atuaram como potencial resposta precoce em estímulo do hormônio etileno e ativação moderada da progressão do processo de abscisão. Também identificamos a presença desses genes em nossa biblioteca de RNA-Seq em respostas a seca em flores e vagem, sugerindo a participação desses genes na abscisão de estruturas reprodutivas.

Na biblioteca analisada do presente estudo também foram identificados vários genes expressos com repetições ricas em leucina (LRR) receptoras de quinases, sendo responsivos à seca e exclusivos para tecidos reprodutivos de soja. As repetições ricas em leucina (LRR) receptoras de quinases chamadas de HAESA (HAE) e HAESA-LIKE são os principais genes da via de sinalização de abscisão em *Arabidopsis* e são ativadas pelo ligante peptídico chamado *Inflorescence Deficient na Abscissão* (AtIDA). Esse modelo IDA-HAE/HSL2 vem sendo alvo de pesquisas fundamentadas em plantas superiores e fornecem evidências pertinentes de que a via de sinalização de abscisão IDA-HAE / HSL2 funciona como via do processo de abscisão (JINN *et al.*, 2000; PATTERSON *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2008; STENVIK *et al.*, 2008; ESTORNELL *et al.*, 2013;; TRANBARGER *et al.*, 2017; WILMOWICZ *et al.*, 2019). Pesquisas futuras poderiam validar a presença dos genes LRR detectados em nossa biblioteca

como atuantes na via de sinalização do ligante IDA-HAE/HSL2 na ativação de abscisão em soja.

No presente trabalho, foi identificado a upregulação da proteína AP2 (*APETALA 2*), que em *Arabidopsis* é um fator de transcrição e está envolvido na regulação do desenvolvimento de flores. No arroz, variações no gene ortólogo ao AP2 denominado *SHATI* elimina completamente as zonas de abscisão resultando na ausência de quebra de grãos de arroz (ZHOU *et al.*, 2012). Os fatores de transcrição *BTB/POZ* também foram detectados tanto em Up/Downregulação em soja e são essenciais na ativação de genes homeóticos. Em *Arabidopsis*, esses genes homeóticos são importantes para o desenvolvimento de zonas de abscisão, são responsáveis por ativar dois genes conhecidos como *BOP1* e *BOP2* (*BLADE ON PETIOLE*) (HA *et al.*, 2004; NORBERG *et al.*, 2005; MCKIM *et al.*, 2008). Os genes *BOP1* e *BOP2* são responsáveis em promover a formação da anatomia necessária para a abscisão de órgãos. Os mutantes duplos de *bop1/bop2* foram capazes de reter todos os órgãos florais e não formaram células AZ florais citologicamente distintas e ativas ou mesmo células vestigiais. Segundo os autores, *BOP1/BOP2* podem ter um papel mais amplo na diferenciação celular, uma vez que regulam o desenvolvimento de órgãos como folhas e flores controlando a atividade de genes homeóticos em folhas e inflorescências. Em tecidos de soja em resposta à seca, sugerimos estar ativo a atuação na diferenciação de células promotoras de abscisão, principalmente desses fatores de transcrição expressos em vagens.

Na biblioteca analisada do presente estudo, o gene *TCPI* (*T-Complex Protein 1*) componente do complexo de chaperonas moleculares, foi upregulado em condições de seca. Este fator de transcrição também foi detectado em zonas de abscisão de folhas em soja, sendo upregulado diferencialmente mais de oito vezes em estímulos ao hormônio etileno (KIM *et al.*, 2015). Segundo os autores, esse fator de transcrição compartilha funções na progressão da abscisão de órgãos e desenvolvimento das células de zonas de abscisão em folhas. De particular interesse, *TCPI* foi altamente expresso nas zonas de abscisão em relação ao pecíolo de folhas em 0 e 12 h sob tratamento de etileno, isto é, em estádios iniciais do tratamento. Os autores propõem que esses TFs atuam no equilíbrio da sinalização de hormônio vegetal, polaridade do órgão e respostas do tipo meristema em células que formam as zonas de abscisão antes do início da separação dos órgãos, e estaria ativo na fase 2 a 3 do processo de formação da zona de abscisão, ou seja, a jusante à efetiva separação dos órgãos (KIM *et al.*, 2015).

Vários genes de defesa do estresse hídrico foram detectados atuando durante a fase reprodutiva, esses genes são considerados multiestresse responsivos, incluindo codificadores de proteínas *heat shock* (chaperonas). Na biblioteca analisada, todos esses genes apresentaram

expressão reduzida sob seca. Sugere-se que o aumento de *TCPI* (*T-Complex Protein 1*) sob seca influenciou na downregulação dessas proteínas *heat shock* (Figura 5). As chaperonas moleculares são proteínas que, em condições de DH contribuem para a homeostase celular uma vez que atuam auxiliando no dobramento de cadeias polipeptídicas recém-formadas, no redobramento de proteínas desnaturadas e na prevenção da agregação de partes proteicas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, prejudicando o dobramento (COOPER, 2002). Estudos demonstram que a superexpressão de chaperonas da família Hsp70 e Hsp40 participa do aumento da tolerância ao DH em diferentes espécies (XIA *et al.*, 2014; AUGUSTINE *et al.*, 2015).

No conjunto de genes codificadores de enzimas modeladoras da parede celular foram detectados na biblioteca de RNA-Seq várias enzimas hidrolases importantes no abortamento de estruturas reprodutivas em consequência da abscisão fundamentada em vários estudos, sendo essas, as enzimas *gamma* (Glyma.11G236100), *pectate lyase* (Glyma.09G071500), *xyloglucan endotransglucosylase* (Glyma.17G065200), *adenine nucleotide alpha hydrolases* (Glyma.12G032900; Glyma.05G165400), *pectinesterase inhibitor 6.0* (Glyma.05G236800), *expansin* (Glyma.13G298100) e *pectinesterase inhibitor 13* (Glyma.17G044700) (JINN *et al.*, 2000; PATTERSON *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2008; STENVIK *et al.*, 2008; ESTORNELL *et al.*, 2013; TRANBARGER *et al.*, 2017; WILMOWICZ *et al.*, 2019).

Em destaque, as enzimas como expansina e xiloglucano endotransglucosilase /hidrolase (XTH) apresentaram modulação aumentada da expressão gênica sob seca no presente estudo. Essas enzimas são conservadas na zona de abscisão de folhas de tomate, soja e flores de *Arabidopsis* descritas por Kim *et al.* (2015). Segundo esses autores, estas enzimas estão ligadas à degradação e síntese da parede celular, e deposição de uma camada limite cerosa que define o plano de “cicatriz” para separação de órgãos. Eles propuseram que a abscisão é uma adaptação de um processo de organogênese de plantas. Tsuchiya *et al.* (2015) em pesquisas com paredes celulares da zona de abscisão no pedicelo em tomate, evidenciaram por meio de análises bioquímicas que a abscisão está associada à elevação dos níveis das enzimas XTH e expansinas, e contribuem para o processo de desprendimento de órgãos. Os níveis mais altos de expansinas foram detectados durante o estágio de amarelecimento, imediatamente antes da abscisão ser efetivada (TSUCHIYA *et al.*, 2015). A presença de altos níveis de transcrição dessas enzimas nos dados analisados do presente estudo, reforça a alta influência do DH na ativação de estágios iniciais da abscisão.

A prospecção desses genes trouxe evidências de genes codificadores de receptor serina/treonina quinase, fatores de transcrição e enzimas modeladoras da parede celular como

expansina e xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase (XTH) responsivos à seca em tecidos reprodutivos da soja. Sugerindo que, em uma condição de seca moderada, a soja é capaz de ativar genes de abscisão com a ocorrência da síntese e acúmulos de transcritos responsáveis por acionar fases primárias de separação de órgãos. O estresse hídrico moderado nas fases R2-R4 pode ter acionado o mecanismo de controle genético de inativação da progressão das fases do complexo IDA-HAE/HSL2 e assim, as plantas de soja mantiveram seu metabolismo ativo de resposta à adaptação para o evitamento progressivo do processo de abscisão.

Outra evidência deste evitamento progressivo do processo de abscisão em consequências de estresse hídrico moderado foi a ausência de acúmulo de transcritos da via do etileno, ABA e interações com auxina (Figura 5), cruciais no progresso da abscisão (WILMOWICZ *et al.*, 2019). Na biblioteca do presente trabalho, esses transcritos apresentaram-se em baixa regulação gênica sob seca. A baixa quantidade desses transcritos pode indicar que atuam na sinalização precoce à perda de água e na ativação primária do processo de abscisão sem grandes perdas, quando aumentada a expressão desses genes poderia ter acarretado no abortamento mais severo das vagens em nossos estudos. Futuros experimentos sob DH altamente severo poderiam detectar o abortamento mais severo e a expressão de genes desses fitohormônios.

6.7 Genes responsivos à seca compartilhados em diferentes genótipos

No presente estudo foi evidenciado pelos dados fisiológicos, um impacto do DH para ambos os genótipos sem efeitos de interação. E no nível molecular a falta genes compartilhados evidencia que há diferenças entre as respostas da expressão gênica nesses genótipos. Além disso, os genes compartilhados para ambos os genótipos (Figura 4B e Tabela 5), possui semelhante perfil de expressão e função desses genes sob seca em ambos genótipos.

Entre os genes compartilhados em ambos os genótipos foi detectado a presença do gene *GRP* - proteínas ricas em glicina (Glyma.14G052000) que funciona como proteção à seca para as membranas plasmáticas em decorrência do aumento da pressão osmótica (KIM *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2013; RINGLI *et al.*, 2001). Plantas de *Arabidopsis* transgênicas com superexpressão de genes *GRPs* resultaram em uma maior taxa de desenvolvimento sob ensaio de seca (YANG *et al.*, 2014). Os genes *GRPs* são considerados genes multiestresse responsivos para condições de seca, salinidade e frio por estarem na rota destes mecanismos por participarem do *crosstalk* entre hormônios auxina e ABA, sendo uma interação hormonal altamente conservada entre as plantas (YANG, 2013; YANG *et al.*, 2014; YAO, 2016;

CZOLPINSKA, 2018). Sob seca este gene está altamente transcrito em ambos os genótipos de soja, o que confirma sua relação positiva com ambientes desfavoráveis, sendo o aumento deste gene candidato a respostas de tolerância à seca.

O gene codificador de proteínas quinases (Glyma.08G120300) também resultou em expressão gênica aumentada na seca. Esse gene codifica proteínas quinases que são uma das maiores famílias de enzimas responsáveis pela comunicação e transdução de sinais na célula (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Mecanismos moleculares que detectam o estresse consistem em uma série de classes de receptores de superfície celular, denominadas de receptores quinases com importância na atividade de comunicação celular (CHAE *et al.*, 2009). Esses receptores celulares, ao detectar enzimas ativadoras do estresse, como a fosfolipase C, liberam e transduzem o sinal de estresse para o meio intracelular e desencadeiam uma cascata gênica para acionar respostas de defesa da planta (TUTEJA; SOPORY, 2008) (Tabela 5 e Figura 5). A primeira etapa na resposta molecular ao DH é a percepção do estresse via receptores específicos de transduções de sinais. Primeiramente, provocam alterações dos níveis citosólicos por proteínas sensoras e ativam uma cascata de fosforilação oxidativa no interior celular que culmina na ativação dos principais genes de resposta ao DH com a modulação dos FTs. Os produtos destes genes levam à adaptação ao DH e contribuem para que a planta seja capaz de sobreviver e superar as condições desfavoráveis (HUANG *et al.*, 2015).

Outro gene responsivo à seca em ambos os genótipos foi o codificador da enzima serina carboxipeptidase (Glyma.13G18370). Esta enzima possui funções na transdução de sinal e no metabolismo secundário para defesa das plantas (CHEN *et al.*, 2020). Este gene mostrou perfil downregulado sob seca corroborando no impacto das respostas de ativação nos metabolismos de defesa à seca em soja.

No experimento, os resultados da expressão apresentaram abundantes genes da família WRKY em condição de seca (Tabela 5 e Figura 5). Esses genes são codificadores de fatores de transcrição importantes na resposta à seca e já foram descritos para várias plantas, como em *Arabidopsis* em resposta a seca e tratamento osmótico (CHEN *et al.*, 2009; BABITHA *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2020). O gene *WRKY* foi identificado com perfil regulado up e downregulado em seca no presente trabalho, assim como detectado no primeiro estudo de transcriptoma em flores e vagem de soja (MOLINARI *et al.*, 2021). Esse gene foi evidenciado em tecidos como flor e vagem em soja sob seca e validado por Molinari *et al.* (2020). Nesse trabalho, membros da família de genes *WRKY* também foi regulado para cima com média de 12x mais expressão sob DH em

comparação ao tratamento controle. Assim, pode-se concluir que alguns genes da família *WRKY* é altamente ativo em respostas associadas ao DH em tecidos reprodutivos de soja.

No algodão, foi descoberto que o gene superexpresso *WRKY33* aumentou a sensibilidade à seca por induzir a via ABA e participar da dinâmica da condutância estomática (XU, 2019). Sob ensaios de estresse hídrico, *Arabidopsis* transgênicas com a superexpressão de *GhWRKY33* gerou murcha precoce comparada com o tipo selvagem devido à perda de água mais rápida e atuou como um regulador negativo para mediar a resposta da planta ao estresse hídrico. Segundo os autores, o gene *WRKY33* participa de um ineficiente fechamento estomático gerando maiores perdas de água (WANG; XU, 2019).

Na biblioteca de RNA-Seq do presente trabalho foi verificado a downregulação na expressão do gene codificador de aquaporina (Glyma.11G143100). Esse comportamento pode ter reduzido a permeabilidade das membranas celulares, acarretando maiores perdas de água em ambos os genótipos analisados (Tabela 5). Assim, a baixa transcrição de aquaporina disponível na célula, impactou no recrutamento e perdas de água em condições de seca. Um estudo realizado com linhagem de soja de murchamento lento PI416937 revelou associação entre AQPs e condutância hidráulica (DEVI *et al.*, 2014). Os autores relataram regulação negativa de AQPs sob condições de déficit em PI 416937, que pode ser devido à redução da captação de água. Plantas transgênicas com superexpressão desses genes de aquaporinas, sugeriram que esses genes estão de fato envolvidos na via de resposta ao estresse e podem ser responsáveis pela proteção de plantas sob condições adversas (SHAO, 2008). Observações semelhantes foram relatadas em arroz, onde a expressão desequilibrada da maioria das aquaporinas nas folhas em comparação com a raiz é considerada como resultando de esgotamento rápido da água da folha e subsequente influência de inibição da fotossíntese (NADA; ABOGADALLAH, 2014).

Assim, os genes compartilhados entre BR16 e EMBRAPA 48 apresentaram o mesmo perfil de regulação em ambos os genótipos em resposta à seca na fase reprodutiva. Esses resultados demonstraram a importância desses genes em situações de escassez de água, elucidando a alta atividade na transdução de sinais e na codificação de proteínas receptoras de superfície celular como importantes alvos na comunicação de estresse do ambiente via canais de sinalização em membranas celulares. Esses dados elucidam uma grande conservação e a participação dos mesmos genes atuando nas primeiras etapas da resposta molecular ao DH nas transduções de sinais de percepção do estresse em diferentes genótipos contrastantes para característica de tolerância e sensibilidade à seca.

7 CONCLUSÃO

O setor do agronegócio de grãos é destaque nacional, no entanto, registros de quedas de produtividade em culturas como a soja têm sido relatados por condições climáticas desfavoráveis como o déficit hídrico. Episódios de seca durante o período reprodutivo causam redução drástica no rendimento de grãos tornando esta fase a mais sensível ao estresse hídrico. O experimento realizado causou estresse de déficit hídrico nos estádios R2 e R4 da soja, onde o efeito fisiológico gerado foram a redução das taxas de condutância estomática, transpiração e fotossíntese. Onde o processo fotossintético foi alvo chave com impactos de até 50% durante a fase reprodutiva devido ao déficit hídrico.

A restrição hídrica estimulou floração precoce nas fases iniciais do período reprodutivo, com interação significativa no início do estresse. Durante o desenvolvimento de flores, foi identificado que o mecanismo de escape é a estratégia de adaptação a situações climáticas extremas para garantir a produção final de órgãos como vagens e sementes.

Por consequências da situação de déficit hídrico, houve impacto no abortamento de vagens acima de 25% em ambos os genótipos testados. No entanto, a imposição do déficit hídrico teve maior agravamento no estádio R4 a nível de efeitos de componentes de produção, causando a redução no número de vagens, número de sementes e peso de grãos. Houve interações significativas no fenótipo biomassa, destacando diferenças na produção de biomassa da parte aérea com maior instabilidade de BR16.

O experimento de seca foi efetivo para analisar o perfil de expressão gênica em 544 DEGs responsivos à seca, dos quais 108 genes foram significativos em flores. Já para o tecido vagem foram identificados 436 DEGs. O déficit hídrico imposto resultou na modulação da expressão gênica e alteração das vias metabólicas durante as fases R2 a R4, afetando a floração e desenvolvimento dos componentes de rendimento como vagens e grãos. Sobre o déficit hídrico, houve modulação na produção de transcritos associados à geração de energia de fontes glicídicas, implicando em problemas na produção de nutrientes sob condições de seca.

A upregulação dos níveis de expressão gênica de genes LRR *Receptor-like serine/threonine*, fatores de transcrição e enzimas modeladoras da parede celular, em destaque as expansinas e hidrolases XTH (*Xiloglucano endotransglucosilase*), é apresentado como genes-alvo responsivos à seca em tecidos reprodutivos da soja associados ao processo de ativação de abscisão prospectados em Bibliotecas de RNA-Seq em nosso experimento controlado.

Assim, o DH provocou mudanças a nível sistêmico na maquinaria molecular com alterações do metabolismo primário das plantas e garantiu o desenvolvimento de aclimação à seca, no qual foram detectados na biblioteca de RNA-Seq, a indução de genes defensivos de plantas para modulação de atividade fisiológica de tolerância à condição de escassez de água. Essa modulação pode ser uma estratégia para preservar e transmitir o material genético para a próxima geração, mesmo resultando em perdas de rendimento na produção final em vagens e sementes conforme dados obtidos nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M.N., ASCH, F., WU, Y., JENSEN, C.R., NAESTED, H., MOGENSEN, V.O., AND KOCH, K.E. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiol.* 130: 591–604, 2002.

ANJUM, S.; XIE, X.-Y.; WANG, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011.

ASCOUGH, G. D., NOGEMANE, N., MTSHALI, N. P., VAN STADEN, J., AND BORNMAN, C. H. Flower abscission: environmental control, internal regulation and physiological responses of plants. *S. Afr. J. Bot.* 71, 287–301. doi: 10.1016/S0254-6299(15)30101-0, 2005.

AUGUSTINE, S.; MISHRA, M. K.; LAKSHMINARASAMMA, N. Adaptive droop control strategy for load sharing and circulating current minimization in low-voltage standalone dc microgrid. *IEEE Transactions Sustainable Energy*, v.6, p.132-141, 2015.

BABITHA KC, RAMU SV, PRUTHVI V, MAHESH P, NATARAJA KN, UDAYAKUMAR M. Co-expression of AtbHLH17 and AtWRKY28 confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*. 2012. *Trans Res.* doi:10.1007/s11248-012-9645-8

BELFIELD, E. J., RUPERTI, B., ROBERTS, J. A., AND MCQUEEN-MASON, S. (2005). Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J. Exp. Bot.* 56, 817–823. doi: 10.1093/jxb/eri076

BELHAJ, K.; CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9(1), 39, 2013.

BERGLUND EC, KIILAINEN A, SYVÄNEN AC. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investig Genet.* 2011;2:23. Published 2011 Nov 24. doi:10.1186/2041-2223-2-23

BORÉM, A. *Melhoramento de Espécies Cultivadas*. viçosa. 2ª Ed. UFV. 2005.

BOYER, J.S., AND WESTGATE, M.E. Grain yields with limited water. *J. Exp. Bot.* 55: 2385–2394, (2004).

CHAE, L.; SUDAT, S.; DUDOIT, S.; ZHU, T.; LUAN, S. Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the Arabidopsis receptor-like kinase gene family. *Molecular Plant*, v.2, p.84-107, 2009.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

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, n. 3, p. 239, 2003.

CHEN LJ, DIAO ZY, SPECHT C, SUNG ZR. Molecular evolution of VEF-domain-containing PcG genes in plants. *Mol Plant*. 2:738–754. 2009.

CHEN, J.; LI, W.-Q.; JIA, Y.-X. The Serine Carboxypeptidase-Like Gene SCPL41 Negatively Regulates Membrane Lipid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 2020, 9, 696. <https://doi.org/10.3390/plants9060696>

CHO, S. K., LARUE, C. T., CHEVALIER, D., WANG, H., JINN, T. L., ZHANG, S., et al. (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. AcadSci. U.S.A.* 105, 15629–15634. doi: 10.1073/pnas.0805539105

CONAB. 2022. Levantamento de Grãos.<<http://www.conab.gov.br/>>. Acessado em: Maio de 2022.

COOPER, G. M. *A célula: uma abordagem molecular*. 2a Ed., São Paulo, ArtMed Editora, 2002.

COVRE, R.A. *Wedring: pipeline para análise de expressão diferencial em experimento de RNA-Seq*. 2013. 88 p. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CZOLPINSKA M, RUREK M. Plant Glycine-Rich Proteins in Stress Response: An Emerging, Still Prospective Story. *Front Plant Sci*. 2018;9:302. Published 2018 Mar 8. doi:10.3389/fpls.2018.00302

del CAMPILLO, E., AND BENNETT, A. B. (1996). Pedicel break strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol*. 111, 813–820. doi: 10.1104/pp.111.3.813

DESCLAUX, D., HUYNH, T., & ROUMET, P. Identification of Soybean Plant Characteristics That Indicate the Timing of Drought Stress. *Crop Science*, 40(June), 716–722, 2000.

DEVI MJ SINCLAIR TR CHEN P CARTER T. 2014. Evaluation of elite southern maturity soybean breeding lines for drought tolerant traits. *Agronomy Journal*106, 1947–1954.

DU et al. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research*, v. 38, n. suppl_2, p. W64-W70, 2010.

ELLIS, C. M., NAGPAL, P., YOUNG, J. C., HAGEN, G., Guilfoyle, T. J., and Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4563–4574. doi: 10.1242/dev.02012

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro. 2. ed. rev. Atual. EMBRAPA, 1997. 212p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2011

ENGELS, C., FUGANTI-PAGLIARINI, R., MARIN, S. R. R., MARCELINO-GUIMARÃES, F. C., OLIVEIRA, M. C. N., KANAMORI, N. Introduction of the *rd29A:AtDREB2A CA* gene into soybean (*Glycine max L. Merrill*) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. *Genet. Mol. Biol.* 36, 556–565, 2013.

ESTORNELL, L. H., AGUSTÍ, J., MERELO, P., TALÓN, M., AND TADEO, F. R. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* 199–200, 48–60. doi:10.1016/j.plantsci.2012.10.008, 2013.

FAN Q, et al. CmWRKY1 Enhances the Dehydration Tolerance of Chrysanthemum through the Regulation of ABA-Associated Genes. *PLoS One.* 2016;11:e0150572. doi: 10.1371/journal.pone.0150572.

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, p.673-689, 2015.

FEHR, W. R., CAVINESS, C. E., BURMOOD, D. T., & PENNINGTON, J. S. Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max (L.) Merrill*. *Crop Science*, 11(6), 929. doi:10.2135/cropsci1971.0011183X001100060051x, 1971.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.E.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. Londrina: Embrapa Soja. 10p (Embrapa Soja. Circular Técnica, 48), 2007.

FLEXAS, J., & MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, 89, 183–189. doi:10.1093/aob/mcf027, 2002.

FUGANTI-PAGLIARINI R; FERREIRA LC, RODRIGUES FA; MOLINARI HBC; MARIN SRR; MOLINARI MDC; MARCOLINO-GOMES J; MERTZ-HENNING LM; FARIAS JRB; DE OLIVEIRA MCN; NEUMAIER N; KANAMORI N; FUJITA Y, MIZOI J; NAKASHIMAK; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K; NEPOMUCENO AL. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. *Front. Plant Sci.* 8:448, 2017.

GONZÁLEZ-CARRANZA, Z. H., WHITELAW, C. A., SWARUP, R., AND ROBERTS, J. A. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 534–543. doi: 10.1104/pp.010610, 2002.

HA, C.M, J.H. JUN, H.G. NAM, J.C. FLETCHER, BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004)

HE GH, et al. Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 2016;16:116. doi: 10.1186/s12870-016-0806-4.

HEATHERLY, L. G. & ELMORE, T. W. Managing inputs for peak production. In *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. Edited by Specht, J. E. e Boerma, H. R. p.451-536. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 2004

HEBERLE et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, v. 16, n. 1, p. 169, 2015.

HONNA, P. T. Obtenção e caracterização molecular e fisiológica de plantas de soja contendo o Gene AtGolS2 sob déficit hídrico. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

HUANG, D.; WANG, S.; ZHANG, B.; SHANG-GUAN, K.; SHI, Y.; ZHANG, D.; LIU, X.; WU, K.; XU, Z.; FU, X.; ZHOU, Y. A gibberellins-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. *The Plant Cell*, v.27, p.1681-1696, 2015

JEON JS, RYOO N, HAHN TR, WALIA H, NAKAMURA Y (2010) Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem* 48(6):383–392

JINN, T. L., STONE, J. M., AND WALKER, J. C. HAESA, an Arabidopsis leucinerich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev.* 14,108–117. doi:10.1101/gad.14.1.108, 2000

M.L. JONES, W.R. Woodson, Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation, *Plant Physiol.* 119 (1999) 755–764.

KAKUMANU, A., AMBAVARAM, M.M., KLUMAS, C., KRISHNAN, A., BATLANG, U., MYERS, E., GRENE, R., AND PEREIRA, A. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. *Plant Physiol.* 160: 846–867, 2012.

KIM Y. O., PAN S., JUNG C. H., KANG H. (2007). A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, atRZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of Arabidopsis thaliana under salt or drought stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 48, 1170–1181. 10.1093/pcp/pcm087

KIM, J.; SUNDARESAN, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; YANG, R.; MEIR, S.; TUCKER, M.L. Examination of the abscission-associated transcriptomes for soybean, tomato, and Arabidopsis highlights the conserved biosynthesis of an extensible extracellular matrix and boundary layer. *Front. Plant Sci.*, 6, 1109, 2015.

KIM , JOONYUP , CHUN, JONG-PIL AND TUCKER, MARK L. Transcriptional Regulation of Abscission Zones. *Plants*, 8, 154; doi:10.3390/plants8060154, 2019.

KIM, J. Four shades of detachment: Regulation of floral organ abscission. *Plant Signal. Behav*, 9, e976154, 2014.

LALONDE, S., BEEBE, D.U., AND SAINI, H.S. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sex. PlantReprod.* 10: 40–48, 1997.

LAWLOR, D.W. Genetic Engineering to improve plant performance under drought: Physiological evaluation of achievements, limitations and possibilities. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p.695–709, 2013

LE, D. T., NISHIYAMA, R., WATANABE, Y., TANAKA, M., SEKI, M., HAM, L. H. TRAN, L. S. P. Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. *PLoS ONE*, 7(11). doi:10.1371/journal.pone.0049522, 2012.

J. LEE, J.J. PARK, S.L. KIM, J. YIM, G. AN, Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint, *Plant Mol. Biol.* 65 (2007) 487–499

JUNG CH, WONG CE, SINGH MB AND BHALLA PL (2012) Comparative genomic analysis of soybean flowering genes. *PLoS One* 7:e38250.

LIU, F., JENSEN, C. R., & ANDERSEN, M. N. Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybeans subjected to different water regimes and exogenous ABA and BA at early reproductive stages. *Annals of Botany*, 94, 405–411. doi:10.1093/aob/mch157, 2004.

LIU *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 2012.

LONG R., YANG Q., KANG J., ZHANG T., WANG H., LI M., et al. . (2013). Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 32, 1289–1298. 10.1007/s00299-013-1443-0

LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *Journal of experimental botany*, v.61, p.3509-17, 2010

MÄKELÄ, P., MCLAUGHLIN, J.E., and BOYER, J.S. (2005). Imaging and quantifying carbohydrate transport to the developing ovaries of maize. *Ann. Bot. (Lond.)* 96: 939–949

MARINHO JP, KANAMORI N, FERREIRA LC, FUGANTI-PAGLIARINI R, CARVALHO JD, FREITAS RA, MARIN SR, RODRIGUES FA, MERTZ-HENNING LM, FARIAS JR, et al. Characterization of molecular and physiological responses under water deficit of genetically modified soybean plants overexpressing the *AtAREB1* transcription factor. *Plant Mol Biol Rep.* 2015;34:410–426

MARINHO, JP et al. Overexpression of full-length and partial DREB2A enhances soybean drought tolerance. *Agronomy Science and Biotechnology*, 8, 1-21. (2022)

MCKIM S.M., G.E. STENVIK, M.A. BUTENKO, W. KRISTIANSEN, S.K. CHO, S.R. HEPWORTH, R.B. AALEN, G.W. HAUGHN, The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*, *Development* 135 (2008)

MCLAUGHLIN, J.E., AND BOYER, J.S. (2004). Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. *Ann. Bot. (Lond.)* 94: 675–689

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research*, v.43, n. W1, p. W566-W570, 2015.

MOLINARI MDC, et al. 2020. Overexpression of AtNCED3 gene improved drought tolerance in soybean in greenhouse and field conditions. *Genet Mol Biol.* 43:1–12.

MOLINARI MDC, et al. Flower and pod genes involved in soybean sensitivity to drought, *Journal of Plant Interactions*, 16:1, 187-200, (2021) DOI: 10.1080/17429145.2021.1921293

MOLINARI, MDC, et al. Flowering process in soybean under water deficit conditions: A review on genetic aspects. *Genetics and Molecular Biology [online]*. 2022, v. 45, n. 1

NADA R. M., ABOGADALLAH G. M. (2014). Aquaporins are major determinants of water use efficiency of rice plants in the field. *Plant Sci.* 227 165–180. 10.1016/j.plantsci.2014.08.006

NAKASHIMA, K.; SUENAGA, K. Toward the Genetic Improvement of Drought Tolerance in Crops. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, v. 51, n. 1, p. 1-10, 2017.

NAVARRO JUNIOR, H. M; COSTA, J. A; Contribuição relativados componentes do rendimento para produção de grãos em soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 37, n. 3, p. 269 – 274. Março. 2002.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. In: BONATTO, E.R. Déficits em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, cap.1, p. 19-44, 2000.

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

NICOLAS, M.E., GLEADOW, R.M., AND DALLING, M.J. (1985). Effect of post-anthesis drought on cell division and starch accumulation in developing wheat grains. *Ann. Bot. (Lond.)* 55: 433–444

NORBERG M, M. HOLMLUND, O. NILSSON, The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs, *Development* 132 (2005)

OKUSHIMA, Y., MITINA, I., QUACH, H. L., and THEOLOGIS, A. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.* 43, 29–46.

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*, 7(October 2003), 129–137, 2004.

PATTERSON, S. E. (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126, 494–500. doi: 10.1104/pp.126.2.494

PEDERSEN, P.; LAUER, J.G. Response of soybean yield components to management system and planting date. *Agronomy Journal*, v. 96, n. 5, p. 1372-1381, 2004.

PINHEIRO, C., & CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882. doi:10.1093/jxb/erq340, 2011.

QUAIL et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 341, 2012

RAMBO, L.; COSTA, J. A.; PIRES FERNANDES, J. L.; PARCIANELLO, G.; FERREIRA GUTTIL, F. Rendimento de grãos da soja em função do arranjo de plantas. *Ciência Rural*, v. 33, n. 03, p. 405-411, 2003

RAY, J. D.; SINCLAIR, T. R. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 49, n. 325, p. 1381–1386, 1 ago. 1998.

RINGLI C, KELLER B AND RYSER U (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1430-1441. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000786>

ROBINSON, M. D., MCCARTHY, D. J., SMYTH, G. K, 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

W. SADOK, T.R. SINCLAIR, Transpiration response of ‘slow-wilting’ and commercial soybean genotypes to three aquaporin inhibitors, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 821–829.

SAINI, H.S. (1997). Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex. Plant Reprod.* 10: 67–73.

SALEHI-LISAR, S.Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. In: *Drought Stress Tolerance in Plants: Physiology and Biochemistry*. New York: Springer International Publishing, v. 1, n.1, p. 1-16, 2016

SANTOS, E. R.; BORGES, P. R. S.; SIEBENEICHLER, S. C.; CERQUEIRA, A. P.; PEREIRA, P. R. Crescimento e teores de pigmentos foliares em feijão-caupi cultivado sob dois ambientes de luminosidade. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 24, n. 4, p. 14-19, 2011

SCHMUTZ J, CANNON SB, SCHLUETER J, MA J, MITROS T, NELSON W AND XU D (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183.

SCHURCH et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use *Rna*, v. 22, n.6, p. 839-851, 2016

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R de C.; REIS, M. S. Melhoramento da Soja. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: ed. UFV, p. 553-604, 2005

SEKI, M. et al. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, n. 3, p. 296–302, 1 jun. 2007

SHAO, HONG-BO LI-YE CHU, HONG-BO SHAO, LI-YE CHU, MING-AN SHAO & CHANG-XING ZHAO (2008) Advances in functional regulation mechanisms of plant aquaporins: Their diversity, gene expression, localization, structure and roles in plant soil-water relations (Review), *Molecular Membrane Biology*, 25:3, 179-191, DOI: [10.1080/09687680801914508](https://doi.org/10.1080/09687680801914508)

SHEORAN, I.S., AND SAINI, H.S. (1996). Drought-induced male sterility in rice: Changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sex. Plant Reprod.* 9: 161–169

SHI, C.L., G.E. STENVIK, A.K. VIE, A.M. BONES, V. PAUTOT, M. PROVENIERS, R.B. AALEN, M.A. BUTENKO, Arabidopsis class I KNOTTED-like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway, *Plant Cell* 23 (2011) 2553–2567

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v.58, p.221-227, 2007.

SINGH, A. P., TRIPATHI, S. K., NATH, P., AND SANE, A. P. (2011). Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes, RbXTH1 and RbXTH2. *J. Exp. Bot.* 62, 5091–5103. doi: 10.1093/jxb/err209

SIRICHANDRA, C.; WASILEWSKA, A.; VLAD, F.; VALON, C.; LEUNG. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *Journal of Experimental Botany*, v.60, p.1439–1463, 2009.

SOUZA, G. M., CATUCHI, T. A., BERTOLLI, S. C., & SORATTO, R. P. (2012). Soybean Under Water Deficit : Physiological and Yield Responses. In J. E. Board (Ed.), *Agricultural and Biological Sciences » "A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships. InTech.* doi:10.5772/54269

STENVIK, G. E., TANDSTAD, N. M., GUO, Y., SHI, C. L., KRISTIANSEN, W., HOLMGREN, A., et al. (2008). The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in Arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *Plant Cell* 20, 1805–1817. doi: 10.1105/tpc.108.059139

SU, Z., MA, X., GUO, H., SUKIRAN, N. L., GUO, B., ASSMANN, S. M., & MA, H. Flower development under drought stress: morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(10), 3785–807. doi:10.1105/tpc.113.115428, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed, p.954, 2013

TAKAHASHI T, MU JH, GASCH A, CHUA NH. Identification by PCR of receptor-like protein kinases from Arabidopsis flowers. *Plant Mol Biol.* 1998 Jul;37(4):587-96. doi: 10.1023/a:1005924817190. PMID: 9687063.

THANKACHAN, A.; THOMAS, M.B. A Study of Next Generation Sequencing Data, Workflow, Application and Platform Comparison. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, p. 012031, 2018

TIAN et al. agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research*, v. 45, n. W1, p. W122-W129, 2017

TIWARI, G.S.B. HAGEN, T. GUILFOYLE, The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription, *Plant Cell* 15 (2003) 533–543

TRANBARGER TJ, FOYONTPHANICH K, ROONGSATTHAM P, PIZOT M, COLLIN M, JANTASURIYARAT C, SURANINPONG P, TRAGOONRUNG S, DUSSERT S, VERDEIL JL, MORCILLO F. Transcriptome Analysis of Cell Wall and NAC Domain Transcription Factor Genes during *Elaeis guineensis* Fruit Ripening: Evidence for Widespread Conservation within Monocot and Eudicot Lineages. *Front Plant Sci.* 2017 Apr 25;8:603. doi: 10.3389/fpls.2017.00603. PMID: 28487710; PMCID: PMC5404384.

TSUCHIYA, M., SATOH, S., AND IWAI, H. (2015). Distribution of XTH, expansin, and secondary-wall-related Cesa in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Front. Plant Sci.* 6:323. doi: 10.3389/fpls.2015.00323

TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Frontiers in Physiology*, v. 3, p. 347, 19 set. 2012.

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.

TUTEJA, N.; SOPORY, S.K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior*, v.8, p.525-536, 2008.

ULMASOV T, G. HAGEN, T.J. GUILFOYLE, Activation and repression of transcription by auxin-response factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 5844–5849.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T. R. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean1. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, n. 354, p. 153–159, 1 jan. 2001

VAN DIJK et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014

VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, v. 45, p. 523–539, 2006.

- WAGNER, G.P.; KIN, K.; LYNCH, V.J. Measurement of mRNA abundance using RNA-Seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in biosciences*, v. 131, n. 4, p. 281-285, 2012.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009
- WEI S, MA X, PAN L, MIAO J, FU J, BAI L, CHEN M. 2017. Transcriptome analysis of *Taxillusi chinensis* (DC.) danser seeds in response to water loss. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0169177.
- WILMOWICZ, E.; KUĆKO, A.; BURCHARDT, S.; PRZYWIECZERSKI, T. Molecular and Hormonal Aspects of Drought-Triggered Flower Shedding in Yellow Lupine. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3731. <https://doi.org/10.3390/ijms20153731>.
- WINGENDER, EDGAR et al. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic acids research*, v. 28, n. 1, p. 316-319, 2000.
- 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, p.703-16, 2008
- XIA, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; SU, X.; LIU, J. Overexpression of a tobacco J-domain protein enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.83, p.100-106, 2014.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, supplement 14, p.S165-S183, 2002.
- XU H, WATANABE KA, ZHANG L, SHEN QJ. 2016. WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*. *DNA Res.* 23:311–323.
- XU C, XIA C, XIA Z, ZHOU X, HUANG J, HUANG Z, ZHANG C. 2018. Physiological and transcriptomic responses of reproductive stage soybean to drought stress. *Plant Cell Rep.* 37:1611–1624.
- YAMAGAMI, A. T; TSUCHISAKA, K. YAMADA, W.F. HADDON, L.A. HARDEN, A. THEOLOGIS, Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 49102–49112

YANG DH, KWAK KJ, KIM MK, PARK SJ, YANG KY, KANG H. Expression of Arabidopsis glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2 or AtGRP7 improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions. *Plant Sci.* 2014 Jan;214:106-12. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.006. Epub 2013 Oct 20. PMID: 24268168.

LONG R., YANG Q., KANG J., ZHANG T., WANG H., LI M., et al. . (2013). Overexpression of a novel salt stress-induced glycine-rich protein gene from alfalfa causes salt and ABA sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 32, 1289–1298. 10.1007/s00299-013-1443-0

YAO L.M.JIANG Y.N.LU X.X.WANG B.ZHOU P.WU T.L.(2016). Overexpression of a glycine-rich protein gene in *Lablab purpureus* improves abiotic stress tolerance. *Genet. Mol. Res.* 15(4): gmr15048063. <https://doi.org/10.4238/gmr15048063>

X.S. ZHANG, S.D. O'NEILL, Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination, *Plant Cell* 5 (1993) 403–418.

ZHAO KX, CHU SS, ZHANG XD, WANG LP, RONO JK, YANG ZM. 2020. AtWRKY21 negatively regulates tolerance to osmotic stress in Arabidopsis. *Environ Exp Bot.* doi:10.1016/j.envexpbot.2019.103920.

