



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO JONAS NAKAYAMA

**ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
RESPONSIVOS AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM
RAÍZES DE SOJA SUBMETIDAS À HIPOXIA**

THIAGO JONAS NAKAYAMA

**ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
RESPONSIVOS AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM
RAÍZES DE SOJA SUBMETIDAS À HIPOXIA**

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

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Co-orientadores: Dr. Norman Neumaier
Dr^a. Fabiana Aparecida Rodrigues

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N163a Nakayama, Thiago Jonas.

Análise do perfil transcricional de genes responsivos ao encharcamento do solo em raízes de soja submetidas à hipoxia / Thiago Jonas Nakayama. – Londrina, 2011.
64 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Co-orientador: Norman Neumaier.

Co-orientador: Fabiana Aparecida Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Raízes (Botânica) – Teses. 2. Raízes (Botânica) – Aspectos genéticos – Teses. 3. Soja – Solos – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Neumaier, Norman. III. Rodrigues, Fabiana Aparecida. IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. V. Instituto Agrônomo do Paraná. VI. EMBRAPA. VII. Título.

CDU 633.34

THIAGO JONAS NAKAYAMA

**ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES RESPONSIVOS
AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM RAÍZES DE SOJA
SUBMETIDAS À HIPOXIA**

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
EMPRAPA SOJA – Londrina - PR

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves
IAPAR – Londrina - PR

Prof. Dr. Luciano do Amarante
UFPEL – Pelotas - RS

Londrina, 23 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, pela formação profissional e pessoal.

À Universidade Estadual de Londrina, pelo acolhimento nestes sete anos.

À Embrapa Soja, pelo acolhimento nestes dois anos.

Aos Professores Dr. Luiz Gonzaga Esteves, Dr. Luciano do Amarante, Dr. Rogério Margis e Dr. Ricardo Vilella Abdelnoor, pela disposição em avaliar este trabalho.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, Dr. Norman Neumaier e à Dr^a. Fabiana Aparecida Rodrigues, pelos ensinamentos, confiança em mim depositada e orientações para a melhoria deste trabalho.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e da Ecofisiologia Vegetal.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos.

À minha família, por tudo.

NAKAYAMA, THIAGO JONAS. **Análise do Perfil Transcricional de Genes Responsivos ao Encharcamento do Solo em Raízes de Soja Submetidas à Hipoxia**. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Em raízes de duas cultivares de soja contrastantes quanto a tolerância ao encharcamento do solo, foram avaliados, via qPCR, os efeitos da hipoxia sobre o perfil transcricional (0,5h, 4h e 28h) de genes envolvidos no catabolismo da sacarose, fermentação alcoólica, respiração alternativa, detoxicação de ROS e sinalização. Raízes das plântulas em estágio de desenvolvimento V1 foram mantidas sob tratamentos de normoxia e hipoxia em solução hidropônica. Todos os dez genes avaliados apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa em pelo menos um dos tempos analisados. Entretanto, nitrato redutase, invertase, catalase e prolina-4-hidroxilase foram pouco responsivas à hipoxia; diferente da álcool desidrogenase, hemoglobina não-simbionte, sacarose sintase, oxidase alternativa, ascorbato peroxidase e trealose-6-fosfato sintase. A hipoxia resultou na superexpressão dos genes ADH e AOX, e em maior intensidade na cultivar sensível (BR 4). De um modo geral, quando comparado a outras espécies vegetais, o perfil transcricional dos genes aqui estudados em soja mostra-se mais parecido ao observado em espécies sensíveis ao encharcamento do solo do que em espécies tolerantes. Supõe-se uma intrincada relação de causa e efeito entre os genes das diferentes rotas metabólicas, sugerindo o envolvimento de metabólitos, tais como piruvato, ROS e RNS na modulação da expressão dos genes aqui estudados.

Palavras-chave: *Glycine max.* qPCR. Hipoxia.

NAKAYAMA, THIAGO JONAS. **Transcriptional Profile Analysis of Genes Responsive to waterlogging in Roots of Soybean Subjected to Hypoxia.** Dissertation (Master's degree) in Biology and Genetics - Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The effects of hypoxia on the transcriptional profile (0,5h, 4h e 28h) of genes involved in sucrose catabolism, alcoholic fermentation, alternative respiration, detoxification of ROS and signaling were evaluated, by qPCR, in roots of two waterlogging tolerance contrasting soybean cultivars. Roots of seedlings in growth stage V1 were kept under normoxia and hypoxia in hydroponic solution (0,5h, 4h e 28h). All ten genes evaluated showed statistically significant differential expression in at least one of the times analyzed. However, nitrate reductase, invertase, catalase and proline-4-hydroxylase were less responsive to hypoxia; different from alcohol dehydrogenase, non-symbiotic hemoglobin, sucrose synthase, alternative oxidase, ascorbate peroxidase and trehalose-6-phosphate synthase. The hypoxic condition resulted in overexpression of ADH and AOX genes, and in greater intensity in the sensitive cultivar (BR 4). In general, when compared to other plant species, the transcriptional profile of genes in soybean is more similar to that observed in waterlogging sensitive species than to the one in tolerant species. The results pointed for an intricate cause-effect relationship among genes from different metabolic pathways, indicating the involvement of metabolites such as pyruvate, ROS and RNS in modulating the expression of the genes studied here.

Keywords: *Glycine max.* qPCR. Hypoxia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Ação regulatória das Prolina hidroxilases consumidoras de O₂ (PHD) no HIF- α (*Hypoxia inducible factor α*) sob normoxia e hipoxia..... 17
- Figura 2 -** Percepção e sinalização da resposta à diminuição de O₂ em células vegetais..... 19
- Figura 3 -** Acúmulo de alanina e reorganização do TCA (ciclo do ácido cítrico) na condição de encharcamento do solo.20
- Figura 4 -** Mobilização de carboidratos e catabolismo da sacarose para suprir o aumento do fluxo glicolítico em resposta ao alagamento.22
- Figura 5 -** Processo anaeróbico na mitocôndria vegetal.....23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1	REGIÕES ALAGÁVEIS	12
3.2	ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO E NA ESTRUTURA DO SOLO	13
3.3	CONSEQUÊNCIAS AGRONÔMICAS NA SOJA	14
3.4	RESPOSTAS DAS PLANTAS	15
3.4.1	Sinalização	15
3.4.2	Alterações Metabólicas.....	19
3.4.3	Alterações Morfo-Anatômicas.....	24
3.5	MÉTODOS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE DE ALAGAMENTO EM PLANTAS PARA ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES	26
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA VIAqPCR.....	28
4	ARTIGO	30
	Introdução	30
	Material e Métodos.....	32
	Resultados	34
	Discussão.....	36
	Conclusões.....	42
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	61
	Anexo A - Delineamento experimental para a coleta do material biológico	62
	Anexo B - Estabilidade de expressão dos genes candidatos referência para normalização da expressão de genes de interesse, calculada pelo algoritmo NormFinder.....	63

Anexo C - Valores médios de estabilidade de expressão (M) e classificação dos genes candidatos referência para normalização da expressão de genes de interesse, calculada pelo algoritmo geNorm.....	64
Anexo D - Determinação do número ótimo de genes referência para a normalização da expressão de genes de interesse.....	65

1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento comum que a monocultura intensiva faz mau uso dos nutrientes do solo, favorece a multiplicação de pragas e o desenvolvimento de doenças. Esses problemas diminuem a rentabilidade devido à redução na produtividade das culturas agrícolas e ao aumento dos gastos com fertilizantes e defensivos. Um exemplo desta situação problemática é a monocultura do arroz irrigado no estado do Rio Grande do Sul, onde o cultivo ininterrupto do arroz provoca a multiplicação de plantas daninhas. Como medidas, os sistemas de pousio ou de rotação arroz irrigado x pecuária de corte extensiva mostram-se uma opção restrita, pois subutiliza e degrada ainda mais os solos de várzea. Assim, um sistema misto arroz x culturas de sequeiro (entre elas, a da soja) é uma alternativa em potencial.

Com a incorporação da cultura da soja nas áreas de várzea, além das vantagens ambientais (redução de insumos devido ao melhor uso dos nutrientes do solo e ao controle de invasoras, insetos e doenças), é uma forma de aumentar a eficiência do sistema produtivo de várzeas porque a soja é uma *commodity* e tem múltiplas finalidades, dentre as quais a produção de biodiesel, produto promissor para o futuro energético.

Entretanto, quando a soja é cultivada em terras de arroz, o excesso de água no solo pode comprometer a produtividade da mesma. Plantas de soja podem apresentar clorose foliar, cessamento do crescimento ou mesmo morrerem quando em solos alagados (RHINE et al., 2010).

Visando melhor expressar o potencial produtivo da soja nas áreas de várzea, medidas para mitigar os danos causados pelo encharcamento do solo vêm sendo desenvolvidas para a leguminosa. A exemplo, tem-se o manejo da água por meio da construção de sulcos/camalhões, que atenuam a ineficiente drenagem natural dos solos hidromórficos (SILVA et al., 2008), assim como a aplicação de produtos de ação fisiológica como inibidores de etileno, que diminuem os abortos florais (THEISEN et al., 2008).

Apesar disso, a maximização do desempenho da cultura da soja em áreas de várzea, objetivando maiores rendimentos a baixos custos, depende do desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao estresse de alagamento. O conhecimento detalhado das alterações morfo-fisiológicas e das cascatas de modificações moleculares que ocorrem nas plantas em resposta às mudanças físico-

químicas e biológicas resultantes do alagamento é fundamental para uma maior rapidez e eficiência na produção de cultivares de soja tolerantes ao alagamento. Portanto, é importante a identificação de genes envolvidos nos mecanismos de tolerância ao alagamento, os quais poderão ser diretamente usados na obtenção de Organismos Geneticamente Modificados (OGM), ou ainda no uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento via seleção assistida, visando ao desenvolvimento de cultivares de soja mais tolerantes a este estresse.

Neste enfoque, o presente trabalho, parte de um projeto maior (Prospecção de genes para tolerância ao estresse de encharcamento em soja) liderado pela Embrapa Clima Temperado, tem por finalidade contribuir na caracterização molecular de mecanismos de tolerância envolvidos no estresse de alagamento. Fundamentado na literatura científica, dez genes foram escolhidos para análise de perfil transcricional em raízes de duas cultivares de soja (contrastantes quanto à tolerância ao alagamento) cujos sistemas radiculares foram submetidos à hipoxia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e caracterizar genes envolvidos nos mecanismos de resposta ao estresse de hipoxia em raízes de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Nas cultivares BR 4 (sensível) e Embrapa 45 (tolerante), avaliar o perfil transcricional dos genes ADH, SUSY, INV, NR, nsHB, AOX, CAT, APX, P4H e TPS via qPCR.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 REGIÕES ALAGÁVEIS

Eventos de alagamento ocorrem comumente em grandes áreas do mundo, afetando o crescimento e a distribuição das plantas terrestres, e levando a perdas de produtividade de muitas espécies de interesse agrônômico visto que a maioria das culturas não foi selecionada para tolerar o estresse de alagamento (GEIGENBERGER, 2003). Eventos de alagamento frequentemente ocorrem em solos rasos, em áreas de várzea, também devido ao excesso de chuva ou ao rápido derretimento da neve (SAIRAM et al., 2008; SHI et al., 2008). O alagamento ainda pode ocorrer em regiões áridas através de irrigação excessiva (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997).

Na Austrália há grandes áreas sujeitas aos eventos de alagamento, problema que pode causar perdas da ordem de 360 milhões de dólares por ano. A maior parte do trigo australiano é cultivado em solo duplex, formado de uma camada de areia sobre uma base relativamente impermeável composta de argila, que, com a ocorrência de chuva, faz o entorno do sistema radicular saturar de água. No oeste australiano, dois milhões de hectares cultivados com trigo estão sujeitos ao alagamento e, dependendo da magnitude da precipitação pluviométrica, a redução da produtividade pode variar de 10% a mais de 50%. Quanto ao algodão australiano, 90% são cultivados através de irrigação, mas quando ocorrem eventos de chuva durante ou após a irrigação, o alagamento pode ser severo, e, em média, há perdas de 11% da produção (DENNIS et al., 2000). Em casos severos, as perdas da produtividade do algodão podem chegar a 40% (HODGSON; CHAN, 1982).

O alagamento é subdividido em encharcamento, onde somente a raiz é alagada; ou em submersão total, em que a planta inteira fica submersa. A cultura do arroz, segundo maior produto agrícola do mundo, é prejudicada pelo alagamento por submersão. Isso ocorre principalmente em regiões tropicais propensas ao alagamento de monções, incluindo algumas das regiões produtoras de arroz mais pobres do mundo, tais como as do leste da Índia. Na América do Norte e na Europa Central, também há problemas de encharcamento em regiões cujo solo tem textura argilosa (DENNIS et al., 2000). Nos EUA, estima-se que o alagamento afete 12% dos solos agriculturáveis (BOYER, 1982). No Japão, a ocorrência de

alagamento é frequente na cultura da soja, visto que além de chuvas recorrentes, vem-se utilizando antigos arrozais para a cultura da mesma. Só em 2003, em torno de 85% da soja produzida no Japão foi cultivada em antigos arrozais (*Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Crop Statistics Section, 2004*).

No Brasil, estima-se que cerca de 28 milhões de hectares estão sujeitos ao encharcamento (solos aluviais e hidromórficos) (MAGALHÃES et al., 2005). Grande parte dessas áreas encontra-se na região dos Cerrados e outra parcela (6,8 milhões de ha), na região Sul. O Estado do Rio Grande do Sul apresenta ecossistemas variados, dentre eles o de várzea, que ocupa 20% do território gaúcho (REIS, 1998), o equivalente a 5.400.000 ha. Estas áreas constituem um recurso produtivo do setor primário da economia que deve ser melhor explorado, visto que são utilizadas basicamente com o cultivo do arroz irrigado e com a pecuária de corte extensiva, não raramente sendo subutilizadas (MARCHEZAN et al., 2002).

3.2 ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO E NA ESTRUTURA DO SOLO

Embora todas as plantas necessitem de água para o crescimento e desenvolvimento, o excesso desta no solo pode ser danoso ou até letal para as plantas terrestres porque bloqueia a troca de oxigênio (O_2) e de outros gases entre o solo e a atmosfera (DREW, 1997) além de alterar a concentração de microelementos (SETTER et al., 2009). A difusão do O_2 na água é 1×10^4 vezes menor do que no ar (ARMSTRONG; DREW, 2002), e O_2 remanescente no solo é consumido em processos aeróbicos da raiz e dos microrganismos do solo, resultando num solo com pressão parcial de O_2 extremamente reduzida (ERNST, 1990; KIRK, SOLIVAS, ALBERTO, 2003). Nessas condições, importantes processos microbianos dependentes de O_2 , tais como a nitrificação (GUTKNECHT; GOODMAN; BALSER, 2006), processo composto de duas etapas na formação de nitrato a partir de amônio, não persistem por muito tempo. Além disso, substâncias tóxicas originadas do metabolismo anaeróbico bacteriano (ácido sulfídrico, ácidos alifáticos de cadeia curta, como o ácido fórmico, acético, propiônico e o butírico) se acumulam (DREW; LYNCH, 1980).

Diferentes grupos de bactérias usam compostos inorgânicos como aceptores de elétrons em uma sequência bem definida de processos anaeróbicos de

oxirredução, intensificando a redução do potencial redox do solo (BLOM; VOESENEK, 1996). O primeiro processo anaeróbico que ocorre é a redução de nitrato (NO_3^-) a amônio (NH_4^+), seguido pela redução de óxidos de manganês e de ferro, respectivamente (ERNST, 1990; KIRK; SOLIVAS; ALBERTO, 2003); e esses íons reduzidos são tóxicos para as plantas. Em potenciais redox entre -75 e -150 mV, o sulfato (SO_4^{2-}) é reduzido a sulfito (SO_3^{2-}) por diversos gêneros de bactérias estritamente anaeróbicas e o sulfito entra aparentemente sem nenhum controle na planta, podendo alcançar níveis de toxidez (KOCH; MENDELSSOHN, 1989).

Ao passo que em solos não alagados a concentração de gás carbônico (CO_2) é em torno de 1 % (v/v) (BORU et al., 2003), em solos alagados pode chegar a 50% (v/v) do total de gases dissolvidos, tornando-se danoso para as plantas (PONNAMPERUMA, 1972). Esse aumento na concentração de CO_2 depende do tipo de solo, da quantidade de matéria orgânica e da atividade microbiana (BOUMA et al., 1997).

Outro efeito do alagamento é a mudança do estado físico do solo através da quebra de grandes agregados em partículas menores (ENGELAAR et al., 1993). Quando o nível da água abaixa, essas partes menores se rearranjam em uma estrutura mais densa, criando poros com diâmetros menores, gerando menor concentração de O_2 e maior resistência mecânica para o crescimento da raiz (ENGELAAR et al., 1993).

3.3 CONSEQUÊNCIAS AGRONÔMICAS NA SOJA

Segundo Setter e Waters (2003), a característica de tolerância ao alagamento é diretamente relacionada à sobrevivência ou à sustentação da taxa de crescimento, acúmulo de biomassa e produção de grãos sob alagamento em relação à condição não alagada. Nesse contexto, a soja é considerada sensível ao alagamento, principalmente durante a germinação e nos estádios vegetativo e reprodutivo iniciais (GITHIRI et al., 2006). Em sementes de soja, a injúria induzida pelo alagamento pode ocorrer antes da protrusão da radícula. Durante a embebição da semente, há absorção excessiva de água, e como consequência, o rompimento físico da mesma (NAKAYAMA et al., 2004). Em trabalho realizado por Sung (1995), 0% e 50% das sementes de soja emergiram quando submetidas a 48 h e 24 h de alagamento, respectivamente.

O encharcamento do solo é mais prejudicial à produtividade da soja quando esta se encontra em estádios reprodutivos do que em estádios vegetativos (RHINE et al., 2010). Scott et al. (1990) observaram redução de 12% na produtividade quando plântulas de soja em estágio V1 (estádio de desenvolvimento da soja em que as folhas unifolioladas estão completamente desenvolvidas) são submetidas a sete dias de encharcamento do solo; e em R2 (florescimento pleno), a produção reduziu 56%. A produtividade da soja reduziu 89 e 129 kg.ha⁻¹ por dia de estresse de encharcamento no estágio vegetativo e reprodutivo, respectivamente (SCOTT et al., 1989). VanToai et al. (2010) observaram que duas semanas de encharcamento em estágio R2 pode reduzir em 100% a produtividade da soja.

Segundo Linkemer, Board e Musgrave (1998), a diminuição da quantidade de ramos é a principal causa da perda de produtividade quando o encharcamento ocorre no estágio V2 (primeira folha trifoliolada encontra-se completamente desenvolvida); já em R1 (início do florescimento) e em R5 (início do enchimento do grão), são a redução da quantidade de vagens por nó reprodutivo, devido ao aborto floral (SIONIT; KRAMER, 1977), e a diminuição do tamanho dos grãos, respectivamente.

3.4 RESPOSTAS DAS PLANTAS

3.4.1 Sinalização

As plantas necessitam perceber, sinalizar e promover alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas adequadas para sobreviverem e se desenvolverem frente às alterações decorrentes do alagamento. Porém, pouco é conhecido principalmente sobre os mecanismos de percepção e de sinalização das células vegetais em resposta ao déficit de O₂.

Em geral, um dos principais efeitos do alagamento é a diminuição da disponibilidade de O₂ para a parte submersa da planta. O efeito da limitação de O₂ no metabolismo celular é dependente da concentração, sendo que em normoxia a respiração aeróbica procede normalmente e a maior parte dos ATPs é gerada via fosforilação oxidativa. Já a hipoxia ocorre quando a diminuição de O₂ disponível começa limitar a produção de ATPs oriundos da fosforilação oxidativa [reduz a capacidade de a Citocromo c oxidase (COX) doar elétrons ao O₂], e anoxia quando

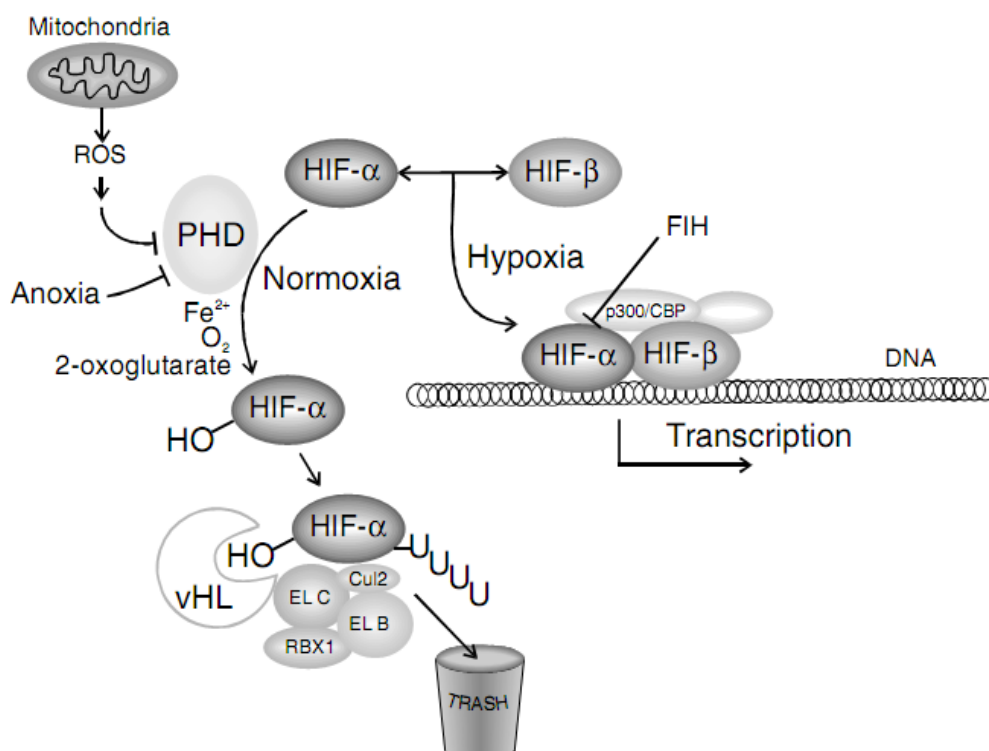
ATPs não são produzidos pela fosforilação oxidativa devido à ausência de O_2 disponível (condição em que a COX não doa elétrons efetivamente para o O_2) (IGAMBERDIEV; HILL, 2009).

Vale ressaltar que células de tecidos que possuem alta taxa metabólica, como o floema e meristema de raiz, estão sujeitas a sofrer hipoxia sob condições normais de crescimento e de desenvolvimento. Nesses tecidos, a taxa de entrada de O_2 via difusão não é suficiente para manter o consumo de oxigênio (GEIGENBERGER, 2003) visto que, diferente dos animais, plantas carecem de um ativo sistema de distribuição de oxigênio para os tecidos.

Bailey-Serres e Chang (2005) sugerem que a sensibilidade ao déficit de O_2 em bactérias, fungos, metazoários e plantas envolve múltiplos sensores diretos/ indiretos e vias de transdução de sinais que se interagem ou são independentes, e que a diversidade nas respostas é resultante de respostas cruzadas entre um ou mais sensores e vias de sinalização.

Em animais, as enzimas prolina hidroxilases consumidoras de O_2 (PHDs) são sensores diretos da disponibilidade de O_2 . Sob condições de normoxia, as PHDs catalisam a hidroxilação de dois resíduos prolina presentes em HIF- α (*Hypoxia inducible factor α* , - subunidade de um fator de transcrição heterodimérico que regula aclimatação ao déficit de O_2), o qual é subsequentemente degradado (GUZY; SCHUMACKER, 2006). Sob anoxia, há a inibição da atividade da PHD e acúmulo do HIF1 α , sendo a ausência de O_2 suficiente para inibir diretamente a atividade da PHD. Porém, sob hipoxia, é necessária a ação adicional das ROS (*Reactive oxygen species*) para ocorrer inibição da atividade da PHD e estabilização de HIF1 α (Figura 1).

Figura 1- Ação regulatória das Prolina hidroxilases consumidoras de O₂ (PHD) no HIF- α (*Hypoxia inducible factor α*) sob normoxia e hipoxia.



Sob normoxia, PHD hidroxila dois resíduos de prolina presentes no HIF- α , sinal para este ser ubiquitinizado e degradado no proteossomo. Sob anoxia, ou hipoxia com presença de ROS, há a inibição da atividade catalítica da PHD e o subsequente acúmulo de HIF- α . Esta dimeriza-se com HIF- β , desencadeando eventos de indução e repressão de diversos genes (Schumacker, 2005).

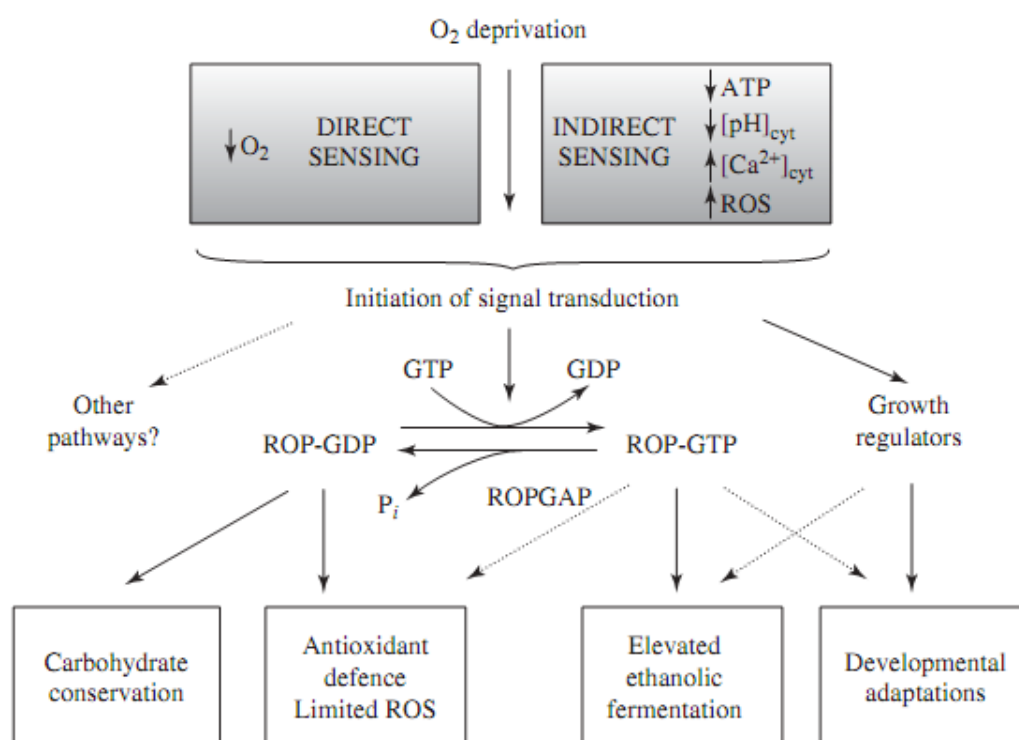
Embora plantas não possuam ortólogo de HIF1 α , mRNAs de PHD são fortemente induzidos sob déficit de O₂ em choupo (*Populus trichocarpa*) (KREUZWIESER et al., 2009) e em arroz (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Há indicação de que existe ação direta da PHD no início da sinalização ao déficit de O₂ em plantas, visto que plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando de forma constitutiva uma das isoformas de PHD (*AtP4H1*), mesmo sob normoxia, apresentam alterações moleculares e estruturais típicas de quando são submetidas ao déficit de O₂ (ASIF et al., 2009).

Em plantas, estudos apontam envolvimento de ROS na resposta ao déficit de O₂ (LIU et al., 2005; LORETI et al., 2005; LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Sua síntese pode ser tanto via complexo III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (RHOADS et al., 2006) quanto via xantina oxidase acetaldéido dependente (SAIRAM; KUMUTHA; EZHILMATHI, 2009) devido, respectivamente, ao aumento na vida média de radicais semiquinona (SUN; TRUMPOWER, 2003) e ao

aumento da concentração de acetaldeído, proveniente da etapa inicial da fermentação alcoólica. Entre as diversas participações, sugere-se que ROS estejam também envolvidos na transdução de sinal via ROP (Proteínas Rho em plantas) e no controle da liberação de Ca^{2+} mitocondrial para o citosol, alterando os perfis de expressão gênica (RHOADS et al., 2006).

Trabalhos mostram que a redução do conteúdo de ATP, o declínio no pH citosólico, assim como mudanças nos níveis de metabólitos, tais como a sacarose (BAILEY-SERRES; CHANG, 2005), o óxido nítrico (NO) (CAPONE; TIWARI; LEVINE, 2004), o etileno e outros fitohormônios (STEFFENS; WANG; SAUTER, 2006) estejam envolvidos como moduladores da transdução de sinal na resposta à aclimatação sob déficit de O_2 (Figura 2).

Figura 2 - Percepção e sinalização da resposta à diminuição de O_2 em células vegetais.



O mecanismo de percepção direta ao O_2 não é conhecido, embora seja indicado o envolvimento da prolina-4-hidroxilase. Já a percepção indireta é modulada via mudanças no pH e na concentração de Ca^{2+} citoplasmáticos, aumento na relação ADP/ATP, e produção de ROS, entre eles, NO e H_2O_2 . A intensificação da expressão do gene ADH e da produção de ROS sucede-se com o acúmulo de ROP-GTP, o qual é atenuado (hidrólise do GTP) pelo ROPGAP, mecanismo de retroalimentação negativa análogo a um reostato, controlando a produção de ROS e de ADH. Quanto às respostas morfo-anatômicas, é observado o envolvimento de fitohormônios. Evidências mostram sobreposição de sinalização entre as vias de resposta (BAILEY-SERRES; CHANG, 2005).

3.4.2 Alterações Metabólicas

O gás oxigênio é de grande importância para as plantas porque, além de necessário em vias metabólicas, como as da biossíntese de esterol e de ácidos graxos, é o aceptor final de elétrons na via da fosforilação oxidativa, a qual fornece a maioria dos ATPs usados no metabolismo celular, e regenera NAD^+ de NADH (GEIGENBERGER, 2003).

Comparado com as 30 a 36 moléculas de ATP produzidas durante a fosforilação oxidativa, o rendimento líquido produzido em nível de substrato é de somente duas a quatro moléculas de ATP por molécula de glicose. Assim, dependendo da demanda por energia, tecidos anaeróbicos podem sofrer crise energética (BAILEY-SERRES;VOESENEK, 2008). Na necessidade de gerar energia sob anaerobiose, há o aumento do fluxo glicolítico e estímulo da fermentação. Esta regenera NAD^+ , processo importante porque o aumento do fluxo glicolítico e a diminuição da respiração aeróbica resultam num aumento na razão NADH/NAD^+ (KREUZWIESER et al., 2009). A enzima glicolítica GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) requer NAD^+ para a reação enzimática, e a reciclagem dessa coenzima é necessária para sustentar o contínuo fluxo glicolítico (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2008).

Muitas plantas ativam a fermentação do ácido láctico como reação inicial à privação de O_2 . O acúmulo de lactato contribui na diminuição do pH citosólico (ROBERTS et al., 1984), causando perda da atividade ótima da enzima lactato desidrogenase (LDH) (HANSON; JACOBSON, 1984), e a fermentação do ácido láctico é sobrepujada pela fermentação alcoólica (ROBERTS et al., 1984). Sabe-se que plantas tolerantes ao alagamento têm a via de fermentação alcoólica ativada, e que mutantes ADH nulos são mais sensíveis ao alagamento (KENNEDY; RUMPHO; FOX, 1992). Porém, os contrastes das duas vias fermentativas são que o etanol difunde-se rapidamente para fora das células, causando perdas consideráveis de carbono durante o estresse de déficit de O_2 , e o lactato pode causar toxidez celular (ROCHA et al., 2010).

Muitas espécies vegetais acumulam altas concentrações de alanina (Ala) sob condição de anoxia sem intoxicar as células (MIYASHITA et al., 2007). Rocha et al. (2010) propõem uma inter-relação do acúmulo de Ala com a reorganização do ciclo do ácido cítrico (TCA), havendo produção de ATPs através

Em geral, a alta taxa fermentativa aumenta a demanda por carboidratos, sugerindo que o suprimento de açúcares seja crítico à sobrevivência da planta sob condição prolongada de hipoxia (KREUZWIESER et al., 2009). Sairam et al. (2009) mostraram que, em *Vigna radiata*, o genótipo tolerante ao alagamento possui maior concentração de carboidratos na raiz e eficientes mecanismos metabólicos relacionados com a mobilização de carboidratos e vias fermentativas, resultados contrastantes aos observados no genótipo sensível.

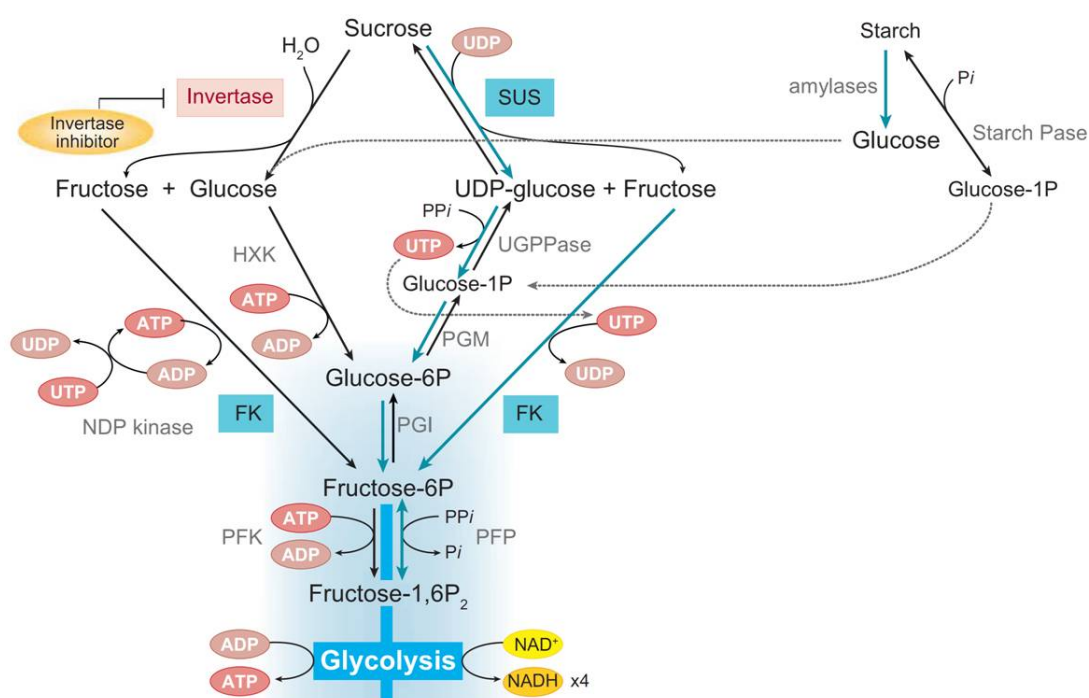
Segundo Geigenberger (2003), são adaptativas as estratégias que priorizam rotas metabólicas que fazem uso mais eficiente da energia e as que diminuem o consumo de O_2 , pois conservam ATP e retardam o início da anoxia, respectivamente. Exemplo referente à economia de energia é a quebra de uma molécula de sacarose envolvendo a ação da SUSY (Sintase da sacarose) e da UGPase (UDP-glicose pirofosforilase), requerendo apenas uma molécula de pirofosfato (PPi); enquanto a ação da invertase e da hexoquinase necessita de duas moléculas de ATP para que ocorra a hidrólise de uma molécula de sacarose (STITT, 1998) (Figura 4). As duas vias bioquímicas citadas anteriormente, que diferem quanto ao custo energético, estão sob controle genético: quando sob baixa concentração de O_2 , genes *Susy* em milho e de batata são induzidos, enquanto genes que codificam a invertase são fortemente reprimidos (ZENG et al., 1998; 1999).

Embora o déficit de O_2 afete a respiração aeróbica, há muitas evidências de que mitocôndrias de plantas possam funcionar mesmo sob condições anóxicas (FOX; KENNEDY, 1991). A exposição à anoxia resulta em algumas mudanças na composição enzimática da mitocôndria (COUEE et al., 1992), mas esta preserva sua ultraestrutura e funcionamento, particularmente quando é exposta ao nitrato (NO_3^-) (VARTAPETIAN et al., 2003). O nitrato faz parte de um ciclo onde o nitrito (NO_2^-) serve de aceptor final de elétrons, auxiliando na oxidação de NADH (IGAMBERDIEV; HILL, 2004), e a redução de nitrito a óxido nítrico (NO) está ligada à síntese de ATP (IGAMBERDIEV et al., 2005; STOIMENOVA et al., 2007) (Figura 5).

A presença de NO_3^- durante a hipoxia reduz a quantidade dos produtos finais da fermentação, e ajuda a manter a concentração de ATP (FAN; HIGASHI; LANE, 1988). A nitrato redutase é ativada sob hipoxia em níveis transcricional e enzimático, enquanto a nitrito redutase é suprimida (BOTREL; MAGNE; KAISER, 1996). O nitrato, sob a ação da nitrato redutase, é metabolizado

em nitrito. Na ausência da nitrito redutase em condição de déficit de O_2 , o nitrito pode ser direcionado para o sistema mitocondrial (PLANCHET; KAISER, 2006), assim como pode ser reduzido em NH_4^+ , importante para o aumento da produção de aminoácidos durante o estresse (IGAMBERDIEV; HILL, 2009).

Figura 4 - Mobilização de carboidratos e catabolismo da sacarose para suprir o aumento do fluxo glicolítico em resposta ao alagamento.

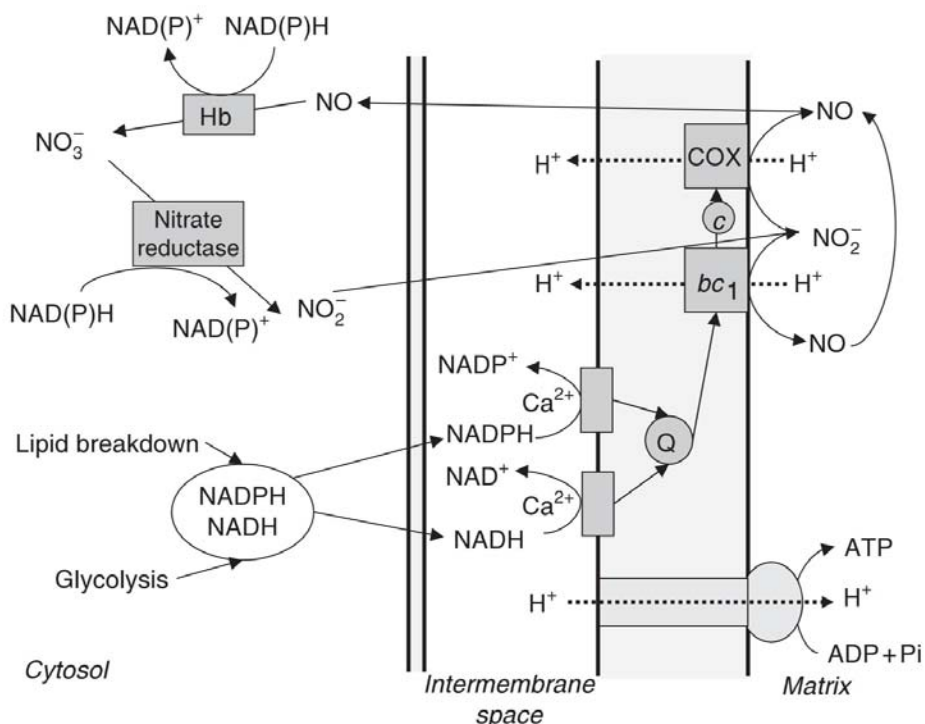


Em algumas plantas e tecidos sob hipoxia, há a indução de amilases, promovendo a conversão de amido em glicose. Já no catabolismo da sacarose, a rota da SUS (Sacarose sintase), a de maior eficiência energética, é regulada positivamente, ao passo que a rota da invertase é regulada negativamente. Setas em azul indicam aumento de fluxo metabólico (Bailey-Serres; Voeselek, 2008).

Existem duas ou mais desidrogenases na face externa da membrana interna das mitocôndrias das plantas (RASMUSSEN; GEISLER; MØLLER, 2008). Elas têm atividade Ca^{2+} dependente, uma específica para o NADH e a outra para NADPH (ROBERTS; FREDLUND; MØLLER, 1995). A oxidação mitocondrial do NAD(P)H citosólico através dessas desidrogenases não resulta na formação do gradiente de prótons no sítio de transporte de elétrons do NAD(P)H para a ubiquinona (MØLLER, 1997). O alto K_m e a dependência de Ca^{2+} dessas enzimas (MØLLER, 1997) sugerem que elas têm importante função quando as concentrações de NAD(P)H e de Ca^{2+} estão elevadas, tal como observado durante

hipoxia (SUBBAIAH; BUSH; SACHS, 1998). Além disso, o NO também estimula a mitocôndria liberar Ca^{2+} (RICHTER, 1997). Isso indica um papel principal da oxidação de NAD(P)H no metabolismo mitocondrial.

Figura 5 - Processo anaeróbico na mitocôndria vegetal.



Desidrogenases, na face externa da membrana mitocondrial interna, oxidam NADH e NADPH vindos do citosol, e transferem elétrons para a ubiquinona (Q). Sob déficit de O_2 , nitrito (NO_2^-) serve como aceptor de elétrons alternativo nos sítios dos complexos III (bc_1) e IV (COX). NO formado nessa reação é convertido, no citosol, pela hemoglobina não simbiótica (Hb) em nitrato (NO_3^-). Este é reduzido em nitrito pela nitrato redutase (IGAMBERDIEV; HILL, 2009, modificado de STOIMENOVA et al., 2007).

A operação dos complexos III e IV, com o nitrito sendo o aceptor final de elétrons (no sítio COX), pode resultar no bombeamento de prótons e estar ligado à síntese de ATP (STOIMENOVA et al., 2007). O óxido nítrico pode se difundir para o citosol e ser convertido em nitrato pela hemoglobina não simbiótica classe I, a qual é induzida sob hipoxia. O nitrato é então reduzido pela nitrato redutase para formar nitrito e o ciclo é repetido (IGAMBERDIEV; HILL, 2009).

Outra estratégia para conservação de energia e redução do consumo de O_2 é a inibição de processos biossintéticos. Essas mudanças do metabolismo são consistentes com a regulação negativa de genes que codificam, por exemplo, enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular, lipídios, flavonóides, respostas de defesa e de degradação de proteínas em raízes de

Arabidopsis (KLOK et al., 2002), algodão (CHRISTIANSON et al., 2009), e de choupo (*Populus x canescens*) (KREUZWIESER et al., 2009) sob condições de hipoxia. Geigenberger et al. (2000), estudando *Solanum tuberosum*, observaram que a diminuição da tensão de O₂ de 20% e 0% resultou numa progressiva inibição da biossíntese de sacarose, de aminoácidos, de proteínas e de lipídios, em duas horas de tratamento. Em raízes de milho foi observado que enquanto a síntese de proteínas aeróbicas foi reprimida, aproximadamente 20 ANPs (*Anaerobic Proteins*) foram induzidas durante o déficit de O₂ (SACHS; FREELING; OKIMOTO, 1980). Além destas proteínas, Chang et al. (2000) também identificaram outras 46 ANPs a partir de seus estudos de proteoma de milho.

Além das respostas de quebra de açúcares, aumento da glicólise, da fermentação e ativação do Ciclo Hemoglobina-Óxido Nítrico frente à diminuição de O₂, muitos outros processos bioquímicos e metabólicos são modulados sob hipoxia, indicando que a resposta ao déficit de O₂ é complexa e envolve mais do que uma simples aclimação no metabolismo energético. Exemplo de outros processos envolvidos na resposta à hipoxia é a modulação de enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Peroxidases, as quais estão envolvidas na detoxificação de ROS (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003), assim como da XET (*Xyloglucan Endotransglycosilase*), relacionada com o afrouxamento da parede celular (SACHS; SUBBAIAH; SAAB, 1996), e ACC sintase (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase), que participa na biossíntese do etileno (OLSON; OETIKER; YANG, 1995). Ambas as enzimas, XET (SAIRAM et al., 2008) e ACC sintase (VISSER et al., 1997), estão envolvidas na formação de aerênquima, tecido com grandes espaços preenchidos de ar que excedem os espaços intercelulares comumente gerados durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, facilitando as trocas gasosas entre a raiz e a porção aérea da planta (JACKSON; ARMSTRONG, 1999).

3.4.3 Alterações Morfo-Anatômicas

Sinergicamente às alterações metabólicas envolvidas na aclimação das plantas frente ao estresse de alagamento, observam-se modificações morfo-anatômicas que possibilitam o escape à baixa concentração de O₂. Em muitas espécies silvestres típicas de regiões alagáveis (SEAGO et al., 2005) e em culturas de arroz (COLMER, 2003), milho (MANO et al., 2006) e trigo (MALIK

et al., 2003), observa-se a presença de aerênquimas e raízes adventícias quando sob alagamento. Em plantas de soja submetidas ao encharcamento do solo, desenvolve-se aerênquima na porção do caule (imediatamente acima da lâmina d'água), na raiz principal, adventícias e laterais, e em nódulos localizados até a 8 cm de profundidade do solo (THOMAS; GUERREIRO; SODEK, 2005).

Além de facilitar as trocas gasosas entre a raiz e a porção aérea, a formação de aerênquima ameniza o déficit de O_2 porque diminui a demanda da raiz por O_2 , como consequência da redução da densidade celular (PEZESHKI, 2001). O aumento da porosidade da raiz (% volume de gás/volume de tecido) facilita a re-aeração da rizosfera, oxidando-a e protegendo o sistema radicular de agentes fitotóxicos procedentes do solo (CHABBI; McKEE; MENDELSSOHN, 2000). Todavia, a difusão radial de O_2 (ROL, *Radial O₂ Loss*) do aerênquima para a rizosfera pode reduzir substancialmente o suprimento de O_2 ao ápice da raiz (ARMSTRONG; BECKETT, 1987).

Embora não encontrada na soja, observa-se uma barreira ao ROL na região basal de raízes adventícias de muitas espécies tolerantes ao alagamento (ARMSTRONG et al., 2000; VISSER et al., 2000; McDONALD; GALWEY; COLMER, 2002). Essa barreira diminui a perda do O_2 para a rizosfera, aumentando a difusão longitudinal do mesmo ao longo do aerênquima em direção ao meristema (COLMER, 2003), favorecendo a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento da raiz. Em *Oryza sativa*, a barreira ao ROL resulta de fibras esclerenquimáticas com espessas paredes secundárias na face externa do córtex (CLARK; HARRIS, 1981). Já em *Phragmites australis*, a combinação de um denso agrupamento celular, depósitos de suberina, e lignificação de camadas celulares mais externas formam a barreira ao ROL (ARMSTRONG et al., 2000).

Em muitas espécies que possuem uma forte barreira ao ROL na zona basal observa-se grande quantidade de raízes laterais que emergem próximas ao eixo principal, auxiliando na assimilação de nutrientes e na absorção de água, sem prejudicar a difusão de O_2 ao longo do eixo principal (ARMSTRONG; ARMSTRONG; BECKETT, 1990). Essa combinação de características anatômicas (aerênquima, barreira ao ROL na zona basal) e morfológicas (raízes laterais próximas à base da raiz) aumenta a aptidão das raízes desenvolverem-se em solos alagados (ARMSTRONG, 1979; ARMSTRONG et al., 1996).

Na soja, após 10 dias de encharcamento do solo, concomitante ao aumento da porosidade das raízes e desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas na base do caule, principais pontos de fluxo de gases entre planta/atmosfera (SHIMAMURA et al., 2010), observa-se nos vasos xilemáticos o aumento de ureídeos e de glutamina próximo aos níveis iniciais, associado com a fixação de nitrogênio; enquanto que a diminuição de alanina restabelece-se apenas parcialmente, sugerindo que certas regiões das raízes permanecem sob metabolismo anaeróbico (THOMAS; GUERREIRO; SODEK, 2005).

Ao passo que plantas de soja sofrem principalmente com o estresse de alagamento até o desenvolvimento de uma rede aerenquimatosa efetiva (SHIMAMURA et al., 2010), muitas plantas tolerantes ao alagamento possuem aerênquima constitutivo (JUSTIN; ARMSTRONG, 1987), sendo este uma característica ancestral que precede o surgimento das angiospermas (EBLE et al., 2003). Baseado em análises morfológicas e filogenéticas, sugere-se que mais de 200 eventos de retorno à competência aquática ocorreram para gerar, taxonomicamente, a variada flora aquática existente hoje. Isso sugere que um número relativamente pequeno de características chaves é necessário para conferir tolerância a ambientes alagáveis.

Visando maximizar a produtividade em solos alagáveis, o conhecimento detalhado sobre os mecanismos que governam as alterações morfo-anatômicas, como também a aclimação metabólica das plantas em resposta à gama de alterações internas e externas desencadeadas pelo alagamento, disponibilizará informações valiosas para elaboração de estratégias em programas de melhoramento.

3.5 MÉTODOS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE DE ALAGAMENTO EM PLANTAS PARA ESTUDOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES

Há diversos métodos descritos na literatura que reproduzem os efeitos do estresse de alagamento, ou parte deles, nas plantas. Em geral, os métodos são: (1) em vasos contendo solo (SAIRAM et al., 2009) ou vermiculita (AMARANTE; SODEK, 2006), em que o nível da água/solução nutritiva fica a 1-3 cm acima da superfície do substrato para reproduzir o estresse de encharcamento, ou acima da altura da planta (DE CARVALHO et al., 2008) para estudos de submersão

total da mesma; (2) em hidroponia, cuja solução nutritiva é saturada de gás argônio (Ar) (RUSSELL; WONG; SACHS, 1990) ou gás nitrogênio (N₂) (BAI et al., 2010), gases inertes que substituem o O₂ antes dissolvido na solução, reduzindo a disponibilidade deste para o sistema radicular; (3) uso de solução nutritiva contendo 0,1% de ágar (solução estagnada) para prevenir convecção (VODNIK et al., 2009); (4) solução nutritiva com óleo mineral para evitar troca gasosa com a atmosfera (DE SOUSA; SODEK, 2003); (5) solução nutritiva sem borbulhamento de gases inertes (solução semi-estagnada) (GHARBI et al., 2009); e (6) em placas verticais (VAN DONGEN et al., 2009) ou câmaras de anaerobiose (BANTI et al., 2008) em que gases inertes substituem o ar atmosférico do recipiente. Observa-se também combinação de métodos, por exemplo, borbulhando de gás N₂ em solução estagnada para obter determinada concentração de O₂ antes do início do tratamento (TEAKLE et al., 2010).

Ao passo que métodos que utilizam gases inertes para remover O₂ também causam diminuição da concentração de CO₂ e etileno (gases que aumentam em quantidade nos solos alagados), o uso de ágar na solução nutritiva, devido à redução da convecção, pode, além de indisponibilizar nutrientes à raiz, resultar numa alta concentração de O₂ na rizosfera em consequência do ROL gerado por raízes aerenquimatosas e do baixo consumo de O₂ pela escassa microbiota presente na solução (WIENGWEERA; GREENWAY; THOMSON, 1997). Segundo os mesmos autores, em soluções semi-estagnadas, a alta convecção mitiga o estabelecimento de um gradiente de concentração de gases entre a rizosfera e a solução, além de permitir troca gasosa substancial entre a mesma e a atmosfera. Já nos experimentos com solos, nota-se a dificuldade em separar a raiz do substrato, gerando/intensificando estresse mecânico e prolongando o tempo de contato da raiz com o ar antes de a mesma ser congelada em nitrogênio líquido.

Portanto, a escolha do método a ser utilizado dependerá dos objetivos, da dimensão do trabalho entre outras limitações do experimento. O estresse de alagamento é complexo, com diversas variáveis, o que dificulta a interpretação dos resultados. Assim, para analisar as respostas moleculares relativas ao déficit de O₂, por exemplo, sugerem-se métodos que utilizem aplicação de gases inertes em solução de hidroponia ou em câmaras de anaerobiose, com a depleção de O₂ antes ou durante o início do tratamento (permite a aclimatação do

organismo ao logo do decaimento da concentração de O₂) dependendo se o objetivo é estudar as respostas imediatas à falta de O₂ ou respostas mais tardias.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA VIA qPCR

O PCR quantitativo (qPCR) comparado a outros métodos de análise local da expressão gênica em nível de transcritos, entre eles o *Northern blot* (BÖHM-HOFSTÄTTER; TSCHERNUTTER; KUNERT, 2010) e o “PCR semiquantitativo competitivo” (BUSTIN, 2000), possibilita gerar resultados mais acurados devido a sua maior sensibilidade numa ampla faixa de detecção, além de não requerer grande quantidade de material (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004), gerar resultados mais rapidamente e poder ser automatizado (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010).

O qPCR mensura o produto amplificado a cada ciclo de reação através da detecção da fluorescência emitida tanto por agentes intercalantes quanto por sondas incorporadas nos produtos de PCR, e a análise é realizada na fase exponencial da corrida de PCR, porque nesta fase a intensidade de fluorescência é teoricamente proporcional à quantidade de produto amplificado. Um agente intercalante bastante utilizado é o SYBRgreen[®], que possui alta afinidade por qualquer DNA dupla fita, sendo o seu uso economicamente vantajoso para análise de grande número de genes. Já o uso de sondas, únicas para cada gene, confere especificidade adicional à gerada pelo par de *primers* utilizado para amplificar a sequência desejada.

Na detecção de fluorescência, ao passo que com o SYBRgreen[®] é gerada fluorescência específica quando este se intercala na molécula de DNA dupla fita, o princípio das sondas *molecular beacons*, *scorpions*[™] e TaqMan[®] é a fluorescência diferencial envolvendo transferência de energia por ressonância. As sondas são marcadas, em suas extremidades, com dois fluoróforos diferentes (*reporter* e *quencher*). Quando excitado, o *reporter* transfere por ressonância a energia para o *quencher* se os dois fluoróforos estiverem próximos um do outro, indicando a não amplificação do fragmento de interesse. Já quando os dois fluoróforos encontram-se separados, seja pela degradação da sonda, atividade exonuclease 5'-3' da enzima *Taq* polimerase (sistema Taqman), ou a exemplo do sistema *molecular beacons* *scorpions*[™], em que ocorre a linearização da sonda, antes em

configuração *hairpin*, e anelamento na sequência alvo, há a emissão de fluorescência pelo *reporter* em intensidade proporcional à quantidade do fragmento de interesse amplificado (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

O qPCR permite determinar a expressão em número de cópias (quantificação absoluta) ou a expressão diferencial de um determinado gene entre dois tratamentos (quantificação relativa).

Ao passo que para a quantificação absoluta é utilizado o método da curva padrão absoluta (procedimento que envolve, entre outras etapas, a geração de produto de PCR, purificações, clonagem em plasmídeos, transcrição reversa *in vitro*, para cada transcrito em estudo) (GIULIETTI et al., 2001), a quantificação relativa pode ser realizada tanto pelo método da curva padrão relativa quanto pelo método comparativo do *Cts* (*Threshold Cycle*) (RAYMAEKERS et al., 2009).

Diferente da quantificação absoluta, os métodos de quantificação relativa permitem corrigir variações não específicas (discrepâncias de quantidade e qualidade entre amostras do cDNA) (BUSTIN, 2002) através da normalização do nível de expressão do gene de interesse pelo nível de expressão do gene referência (BRUNNER et al., 2004). A expressão do gene referência deve se manter constante entre diferentes tecidos e sob diferentes condições experimentais (ARTICO et al., 2010). Portanto, deve-se atentar para quais genes referência utilizar na normalização, visto que cada condição experimental e tipo de tecido demandam um conjunto específico desses genes (HU et al., 2009). Para a escolha dos genes referência, programas como o NomFinder (ANDERSEN; ORNTOFT, 2004) e geNorm (VANDESOMPELE, ET AL., 2002), utilizam algoritmos diferentes para ranquear, em termos de estabilidade de expressão, os genes candidatos referência.

O método da curva padrão relativa, devido às diluições do padrão, que pode ser qualquer amostra de cDNA, usa mais reagentes e ocupa mais espaço na placa de reação do que o método de comparação de *Cts*, que dispensa o uso de diluições. Outra vantagem do método de comparação de *Cts* é a possibilidade do uso de algoritmos matemáticos, a exemplo do usado no programa REST 2009 V2.0.13 (Qiagen), que, além de permitir entrada das eficiências de reação dos genes alvo e de diferentes genes referências para ajustar os dados, fornece o intervalo de confiança de 95% e a significância estatística da expressão gênica por meio de randomizações e *bootstrapping* dos valores entre grupos amostra e controle.

4 ARTIGO

Análise do Perfil Transcricional de Genes Responsivos ao Encharcamento do Solo em Raízes de Soja Submetidas à Hipoxia

Manuscrito a ser submetido à publicação no periódico: *Environmental and Experimental Botany*

Resumo

Em raízes de duas cultivares de soja contrastantes quanto a tolerância ao encharcamento do solo, foram avaliados, via qPCR, os efeitos da hipoxia sobre o perfil transcricional (0,5h, 4h e 28h) de genes envolvidos no catabolismo da sacarose, fermentação alcoólica, respiração alternativa, detoxicação de ROS e sinalização. Raízes das plântulas em estágio de desenvolvimento V1 foram mantidas sob tratamentos de normoxia e hipoxia em solução hidropônica. Todos os dez genes avaliados apresentaram expressão diferencial estatisticamente significativa em pelo menos um dos tempos analisados. Entretanto, nitrato redutase, invertase, catalase e prolina-4-hidroxilase foram pouco responsivas à hipoxia; diferente da álcool desidrogenase, hemoglobina não-simbionte, sacarose sintase, oxidase alternativa, ascorbato peroxidase e trealose-6-fosfato sintase. A hipoxia resultou na superexpressão dos genes ADH e AOX, e em maior intensidade na cultivar sensível (BR 4). De um modo geral, quando comparado a outras espécies vegetais, o perfil transcricional dos genes aqui estudados em soja mostra-se mais parecido ao observado em espécies sensíveis ao encharcamento do solo do que em espécies tolerantes. Supõe-se uma intrincada relação de causa e efeito entre os genes das diferentes rotas metabólicas, sugerindo o envolvimento de metabólitos, tais como piruvato, ROS e RNS na modulação da expressão dos genes aqui estudados.

Palavras-chave: *Glycine max.* qPCR. Hipoxia.

Introdução

Eventos de alagamento, que podem ocorrer por encharcamento do solo ou por submersão completa da planta, ocorrem mundialmente, influenciando a composição de espécies das comunidades silvestres (Parolin e Wittmann, 2010) e afetando a produtividade de muitas culturas agrícolas (Verhoeven e Setter, 2010), entre as quais, a da soja (Rhine et al., 2010), que vem sendo também cultivada em solos alagáveis para, entre outros motivos, a rotação com o arroz irrigado. As

causas do estresse de alagamento são complexas, envolvendo alterações físico-químicas, estruturais e na microbiota do solo, e diversas, causando efeitos de maior ou menor intensidade dependendo da composição do solo e da duração do estresse (Setter et al., 2009). No solo alagado, observam-se alteração no pH, na concentração de gases (principalmente O₂, CO₂, etileno e metano), acúmulo de ácidos orgânicos e de elementos como o Fe, Mn, Na, Al e B (Setter et al., 2009; Unger et al., 2009; Laanbroek, 2010).

Devido à difusão dos gases ser quatro ordens de magnitude menor na água em relação ao ar (Armstrong e Drew, 2002), o alagamento reduz a disponibilidade de O₂ para a porção submersa da planta, gerando hipoxia ou anoxia (depleção parcial, e total de O₂, respectivamente) (Bailey-Serres e Voesenek, 2008). Os efeitos deletérios do déficit de O₂ em nível celular incluem diminuição da relação ATP/ADP, acidose celular, e acúmulo de metabólitos tóxicos (exemplo, acetaldeído) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Colmer e Voesenek, 2009).

A respiração aeróbica é reduzida parcial ou totalmente inibida em condição de hipoxia e anoxia, respectivamente (Igamberdiev e Hill, 2009). Entre os ajustes metabólicos para gerar energia em anaerobiose estão o catabolismo da sacarose para suprir o aumento do fluxo glicolítico, assim como a intensificação das vias fermentativas para regenerar NAD⁺, necessário na glicólise (Bailey-Serres e Voesenek, 2008). Além disso, ocorre síntese de ATP e regeneração de NAD(P)⁺ na respiração alternativa, envolvendo a participação de mitocôndrias e de enzimas citoplasmáticas, com o nitrito sendo o aceptor alternativo de elétrons (Igamberdiev e Hill, 2009). Para contrabalancear a produção de ROS durante e principalmente após o alagamento, há a participação de enzimas do sistema de defesa antioxidativo (Blokhina et al., 2003).

Observa-se um controle genético nos mecanismos de resposta ao déficit de O₂, conhecimento este que tem avançado rapidamente nos últimos anos como consequência de novas técnicas de análise de expressão gênica em espécies modelo como *Arabidopsis* (Liu et al., 2005) ou choupo (*Populus trichocarpa*) (Kreuzwieser et al., 2009), e em culturas comerciais como milho (Zou et al., 2010) e arroz (Narsai et al., 2009). Para a sojasob hipoxia, há poucos trabalhos de expressão gênica em nível de transcritos (Komatsu et al., 2009), e a maioria é de proteômica em respostas tardias (2-3 dias de estresse) e em estágio de desenvolvimento germinativo (Shi et al., 2008, Komatsu et al., 2010a, 2010b),

havendo a necessidade de mais informações em nível de transcritos, em outros estádios de desenvolvimento e em diferentes tempos de estresse, incluindo respostas iniciais.

Assim, neste estudo visamos analisar os efeitos da hipoxia sobre o perfil transcricional (0,5h, 4h e 28h) de genes envolvidos no catabolismo da sacarose, fermentação alcoólica, respiração alternativa, detoxicação de ROS, e sinalização em raízes de duas cultivares de soja contrastantes ao estresse de encharcamento do solo.

Material e Métodos

Material Biológico e Desenho Experimental

As cultivares Embrapa 45 (Tolerante) e BR 4 (Sensível) foram selecionadas para o presente estudo tendo como base o alto contraste de desempenho observado na análise de diversas cultivares sob condição de encharcamento do solo, realizado no campo experimental da Embrapa Clima Temperado (Barnech, 2009; informação pessoal).

As sementes foram germinadas em papel de filtro umedecido com água destilada, em câmara de crescimento a 25°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 100%. As plântulas foram transplantadas para o sistema hidropônico (apenas as raízes das mesmas foram imersas na solução) e cultivadas em casa de vegetação durante nove dias sob temperatura de $26 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $66 \pm 7\%$, até que atingissem o estádio de desenvolvimento V1: folhas unifolioladas completamente desenvolvidas (Fehr et al., 1971). A solução nutritiva (HEWITT, 1963), foi acondicionada em caixas plásticas azuis escuras (36 litros). Para oxigenação das raízes até a aplicação dos tratamentos, a solução recebeu aeração contínua de ar atmosférico via aeradores de aquário comercial.

O delineamento experimental consistiu em três blocos casualizados [02 cultivares x 02 condições de tratamento (normoxia, hipoxia) x 03 tempos (0,5h, 4h e 28h)], em quadruplicatas (Anexo 1). Ao passo que no tratamento de normoxia a solução recebeu aeração contínua de ar atmosférico, no tratamento de hipoxia a solução foi borbulhada continuamente com gás N_2 , método semelhante ao utilizado por Bai et al. (2010). A solução foi desoxigenada antes de começar o tratamento de

hipoxia. A concentração de O₂ dissolvido na solução foi quantificada utilizando o medidor de tensão de O₂ (HI 9146, Hanna). Para cada tempo, as raízes dos tratamentos normoxia e hipoxia foram coletadas em simultâneo e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois estocadas a -80°C até a extração de RNA.

Em cada tempo (0,5h, 4h e 28h), as raízes dos tratamentos normoxia e hipoxia foram coletadas simultaneamente

Análise de Expressão Gênica

A expressão gênica de raízes foi analisada via PCR quantitativo (qPCR). Dez genes conhecidos na literatura científica envolvidos em respostas de defesa contra a hipoxia tiveram sua expressão avaliada (As descrições dos dez genes e os mecanismos nos quais eles estão envolvidos estão listados na Tabela 1). Com base em informações da literatura científica (Liu et al., 2005, Branco-Price et al., 2008, van Dongen et al., 2009) a sequência de aminoácidos de uma das isoformas para cada gene em *Arabidopsis thaliana* foi recuperada do banco de dados do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) (Swarbreck et al., 2008) e feita a busca pela sequência de maior similaridade em soja no banco de dados do Phytozome (Schmutz et al., 2010) usando o BLASTp (Ye et al., 2006); então BLASTp das sequências selecionadas da soja foi feito contra o banco de dados do TAIR para identificar, em *Arabidopsis*, o homólogo de maior similaridade. *Primers* específicos, determinados na região 3' UTR (3' *untranslated region*), foram desenhados com auxílio do programa *Primer Express 3.0 (Applied Biosystems)*. Para isso, a região específica da isoforma de interesse foi encontrada com base no alinhamento global, Clustal W2 (Larkin et al., 2007), das isoformas para cada gene em estudo. O RNA total da raiz foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop, ND-1000), e a integridade do mesmo foi analisada em gel de agarose 1%. O RNA total foi tratado com DNase (Invitrogen) e transcrito em cDNA usando o kit *SuperscriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), com modificação das instruções do fabricante [adição de 1 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0.5 µg/µl), e 1 µl de hexâmeros randômicos (50 ng/µl) para 1X volume final de reação]. Não foi observado presença de DNA genômico nas amostras de

cDNA através de PCR usando *primers* que flanqueiam um íntron do gene β -actina. As reações de qPCR foram conduzidas com o *kit SYBR Green Master Mix* (Invitrogen) no termociclador 7300 *Real Time Systems* (Applied Biosystems). As reações foram feitas usando 2 μ l de cDNA (~ 6,9 ng de cDNA/reação), 60-300 nM de *primers* F (*Foward*) e R (*Reverse*) (Tabela 2), 6,5 μ L de *SYBR Green* (Invitrogen) e água ultrapura estéril para completar o volume final de 12,5 μ L. A concentração de cada par de *primers* foi determinada através de otimizações da eficiência de reação (E) (Tabela 2), cujo cálculo é $E = 10^{-1/slope}$. O *slope* pertence à curva padrão, gerada por 3 a 5 pontos de diluições seriadas Ct (*Threshold Cycle*) de uma amostra de cDNA, medidas em duplicatas. As condições das reações foram de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min. O *threshold* e o *baseline* foram ajustados manualmente para cada gene usando o *software 7300 System SDS RQ Study* (Applied Biosystems). Os genes referência ELF1B (Fator de alongamento 1 β) (Jian et al., 2008) e β -actina (Byfield et al., 2006), concentração dos *primers* a 60 nM, eficiência de amplificação a 95,5% e 94,4%, respectivamente, foram escolhidos para normalizar a expressão dos genes alvos, com base no estudo da estabilidade de expressão (hipoxia x normoxia) de cinco genes candidatos referência (Anexo 2). A especificidade da amplificação foi avaliada através da curva de dissociação de cada gene investigado. A análise dos dados de expressão foi realizada pelo software REST 2009 (Qiagen).

Resultados

A concentração de O₂ na solução nutritiva borbulhada com ar atmosférico, tratamento de normoxia, apresentou mínima de 7,1 mg l⁻¹ e máxima de 7,8 mg l⁻¹; já no tratamento de hipoxia, com aplicação de N₂ gasoso na solução visando à retirada do O₂, a concentração mínima e máxima de O₂ foi 0,1 e 0,3 mg l⁻¹, respectivamente (Figura 1). Isso indica que as condições de normoxia e de hipoxia foram aplicadas do início ao fim do experimento.

Diferente de trabalhos de qPCR que usam apenas o tempo 0h para a calibração da expressão gênica; no presente estudo, a abundância de transcritos do tratamento de hipoxia foi comparada com a do respectivo tratamento de normoxia para cada tempo analisado. Este procedimento favorece avaliar apenas os efeitos

da hipoxia sobre a expressão diferencial dos genes, eliminando efeitos aditivos, como ritmo circadiano e diferenças de desenvolvimento.

Apenas para o gene que codifica a proteína nsHB (Hemoglobina não-simbionte: Glyma11g12980) da cultivar Embrapa 45 não foi observado sinal de amplificação da reação de qPCR, muito provavelmente devido a não complementaridade entre o cDNA e o *primer*. Isto evidencia diferença de sequência na região 3'UTR do gene nsHB entre as cultivares Embrapa 45 e BR 4, da qual foi observado amplificação da nsHB, e à Williams 82, da qual o genoma foi sequenciado (Schmutz et al., 2010) e em que o desenho dos *primers* foi baseado. Para os demais genes houve amplificação da reação de qPCR, mostrando-se expressos em ambas as cultivares em todos os tempos avaliados dos tratamentos de hipoxia e normoxia (dados não mostrados).

Todos os genes apresentaram expressão diferencial significativa estatisticamente (ED:abundância de transcritos sob hipoxia/abundância sob normoxia para cada tempo em cada cultivar; $P[H1] < 0,01$) em pelo menos um dos tempos analisados (0,5h; 4h e 28h) em ambas as cultivares, exceto para a catalase (CAT: Glyma06g02040), que foi diferencialmente expressa apenas na BR 4 (ED = 1,6 vezes, 28h) (Tabela 2).

Entre os genes NR (Nitrato redutase: Glyma06g11430), INV (Invertase: Glyma10g35890, Glyma20g31730), CAT e P4H (Prolina-4-hidroxilase: Glyma10g44480) nos três tempos avaliados, a ED máxima observada foi próxima de duas vezes (1,9X) (NR, BR 4, 4h); já para a ADH (Álcool desidrogenase: Glyma04g41990, Glyma06g12780) e nsHB, a ED mínima foi de 36X (Embrapa 45, 0,5h) e 2,8X (BR 4, 0,5h), e a máxima foi de 167,4X (BR 4, 4h) e 78X (BR 4, 4h), respectivamente (Tabela 2). Discrepância na intensidade de expressão entre esses dois grupos de genes também ocorre em plântulas de *Arabidopsis* sob hipoxia (Van Dongen et al., 2009; Liu et al., 2005).

Dos dez genes estudados, maior número de genes foi diferencialmente expresso ($P[H1] < 0,05$) na cultivar BR 4 do que na Embrapa 45, principalmente no tempo 0,5h (ADH, nsHB, SUSY [Sacarose sintase: Glyma13g17420], AOX [Oxidase alternativa: Glyma04g14800], APX [Ascorbato peroxidase: Glyma12g07780], NR e INV; BR 4), (ADH e NR; Embrapa 45), e a exemplo do gene CAT, cuja ED foi detectada apenas na BR 4 (ED = 1,6X, 28h) (Tabela 2). Além disso, nos tempos 4h e 28h, a ED dos genes ADH (167X e 85X) e

AOX (6,1X e 141,3X) na BR 4 foi superior à detectada na Embrapa 45 (103X e 48X) e (2,6X e 48,8X). Porém, considerando um *threshold* $>2X$ e $< -2X$ da ED, as duas cultivares apresentaram padrão de expressão mais próximo, com aumento da quantidade de genes diferencialmente expressos (GDEs) no decorrer do tratamento de hipoxia (Tabela 2). O aumento temporal de GDEs sob déficit de O_2 é observado tanto em transcriptomas de espécies tolerantes à hipoxia, como *Populus trichocarpa* (Kreuzwieser et al., 2009) e arroz (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007), quanto em espécie sensível, *Arabidopsis* (van Dongen et al., 2009); o aumento temporal dos GDEs em sementes de arroz em germinação sob anoxia é similar ao aumento temporal dos metabólitos (Narsai et al., 2009), o que indica uma correlação positiva entre o aumento na quantidade de transcritos e o aumento da atividade catalítica de enzimas correspondentes.

EDs maiores que 2X foram observadas para a ADH, nsHB, SUSY e AOX (Tabela 2). Exceto para a nsHB, que não foi possível analisar a expressão na Embrapa 45, em ambas as cultivares, enquanto a ADH, nsHB e SUSY apresentaram pico de ED no tempo 4h, AOX foi mais diferencialmente expressa após 28h. Já a APX e TPS (Trealose-6-fosfato sintase: Glyma17g07530) apresentaram ED $< -2X$ após 28h em ambas as cultivares (Tabela 2).

Discussão

Dos dez genes estudados aqui, seis deles apresentaram ED $> 2X$ ou $< -2X$ (Tabela 2). Eles estão envolvidos no catabolismo da sacarose (SUSY), fermentação alcoólica (ADH), respiração alternativa (nsHB), prevenção e detoxicação de ROS (AOX e APX) e sinalização (TPS) (Tabela 1).

Sabe-se que sob concentrações internas de O_2 próximas à anoxia, plantas aumentam a atividade glicolítica, a fermentação láctica e etanólica (Geigenberger, 2003) em detrimento do ciclo TCA (Rocha et al., 2010) e da respiração aeróbica (Zabalza et al., 2009); isto é, ocorre o efeito Pasteur. Este efeito pode estar relacionado à maior ED positiva (*up regulation*) da SUSY comparada à da INV e à alta ED positiva da ADH aqui observadas (Tabela 2), e também visto que a concentração de O_2 foi próxima a zero $mg\ l^{-1}$ durante todo o tratamento de hipoxia (Figura 1).

Kreuzwieser et al (2009) sugerem que as divergências de resultados entre estudos de transcriptoma de espécies tolerantes (*Populus trichocarpa*, Arroz) e sensíveis (*Arabidopsis*) não sejam apenas devido às diferenças nas condições experimentais, havendo o componente genético influenciando as discrepâncias na quantidade de GDEs, intensidade de expressão e perfil transcricional. Nós sugerimos que a soja, em relação ao *Populus trichocarpa*, espécie tolerante à hipoxia (Kreuzwieser et al., 2002, 2009), tenha um controle genético, em nível de transcritos, menos eficiente sobre o catabolismo da sacarose (menor relação de ED da SUSY/INV) e na manutenção dos subprodutos da glicólise (maior ED da ADH). A alta ED positiva da ADH durante as 28h de hipoxia e a diminuição da ED da SUSY após 4h de hipoxia, assim como a baixa ED da INV (ED máxima: 1,4X; mínima: -1,4X) na soja (Tabela 2) são parecidos ao perfil transcricional em *Arabidopsis* (Liu et al., 2005; Van Dongen et al., 2008), espécie sensível à hipoxia; apesar de na soja a ED positiva da SUSY ser menor e da ADH ser mais acentuada do que em *Arabidopsis*. Já em *Populus trichocarpa*, a ADH e a SUSY foram induzidas em nível de transcritos (*Upregulated*) moderada e consistentemente ao longo 168h sob hipoxia (ED: ADH 8,6X-9X; SUSY 4,6X-12X), ao passo que a invertase foi reprimida (*Downregulated*) (ED: -5X) (Kreuzwieser et al., 2009).

A enzima ADH (EC: 1.1.1.1) tem importante papel em manter o contínuo fluxo glicolítico através da oxidação de NADH em NAD⁺, coenzima necessária para a reação enzimática da GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase) (EC: 1.2.1.12) (Fukao e Bailey-Serres, 2008), e em regular a concentração do piruvato, interferente da inibição da respiração aeróbica induzida pela hipoxia (Zabalza et al., 2009). Porém, é conveniente uma moderada fermentação alcoólica para diminuir perdas de carbono via difusão do etanol (Rocha et al. 2010) e evitar a produção de acetaldeído, que é citotóxico (Bailey-Serres e Voeselek, 2008) e fonte de ROS via xantina oxidase (Sairam et al., 2009). Nas plantas aqui estudadas, a alta indução transcricional da ADH (ED ≥ 36X) pode estar relacionada com o ineficiente controle transcricional na mudança da rota da INV (ED: 1,3 a 1,4X, BR 4; -1,4 a 1,4X, Embrapa 45) para a da SUSY (ED: 1,2 a 3,1X, BR 4; 1,7 a 4,4X, Embrapa 45) (Tabela 2), cujas enzimas apresentam K_m de 7-15 mM e 40-200 mM, respectivamente (Avigad, 1982). Trethewey et al. (1998) observaram altos níveis de piruvato e intensificação da respiração em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) super-expressando a invertase. Intensificação da respiração

comprovada por Zabalza et al. (2009) em raízes de *Pisum sativum*, observada mesmo sob baixas concentrações internas de O₂. Eles também evidenciaram que ocorre aumento da fermentação alcoólica apenas quando sob crise energética, resposta típica decorrente da hipoxia. Isso pode ser confirmado por Bologna et al. (2003), os quais evidenciaram que a mudança da rota da INV para a rota da SUSY em *Solanum tuberosum* permite maior estado energético celular, e menor atividade respiratória e fermentativa sob baixas tensões de O₂.

Nas mitocôndrias, a síntese de ATPs acoplado ao transporte de elétrons da cadeia respiratória ocorre mesmo durante a anaerobiose, porém com o nitrito (acceptor alternativo de elétrons) sendo reduzido a NO (Óxido Nítrico), processo conhecido como respiração alternativa (Stoimenova et al., 2007). Este fluxo metabólico é parte do ciclo Hb/NO (Igamberdiev e Hill, 2004), em que o NO difunde-se para o citosol e pode ser convertido a nitrato pela nsHB1, e nitrato reduzido a nitrito pela NR (EC: 1.7.1.1). Estes dois processos contribuem no controle da razão NAD(P)H/NAD(P)⁺ e podem aliviar o papel da fermentação na manutenção do potencial redox celular, como observado em trabalho usando plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) tratadas com tungstato ou mutantes NR não funcionais (Stoimenova et al., 2003). Em resposta à hipoxia, nossos resultados em raízes de soja (Tabela 2), assim como em plântulas inteiras de *Arabidopsis* (Liu et al., 2005), em nível de transcritos, diferente da nsHB, que foi altamente expressa, NR mostrou-se com baixa ED. O perfil transcricional da NR em raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sob anoxia (Allègre et al., 2004) foi similar ao observado na cultivar BR 4, onde o nível transcricional da NR foi reprimido -1,8X após 28h de hipoxia (Tabela 2). Já na Embrapa 45 não foi detectado ED neste mesmo tempo, embora, em ambas as cultivares, NR apresentou ED positiva em 0,5h e 4h (Tabela 2). Apesar da repressão transcricional, Allègre et al. (2004) observaram aumento significativo da atividade catalítica da enzima NR durante 48h de anoxia devido a alterações pós-traducionais: defosforilação da NR e dissociação da proteína inibidora 14-3-3. Entretanto, Brandão e Sodek (2009) observaram forte redução da atividade da NR em raízes de soja sob hipoxia, e não variação na proporção das formas ativa:inativa. Isto sugere, quanto à expressão do gene NR em resposta à hipoxia, que embora haja correlação positiva em nível de transcritos, ocorre efeito oposto na atividade catalítica devido à discrepância no controle pós-traducional da enzima NR entre plantas de tomate e de soja.

Apesar de parecer contraditória a indução do metabolismo oxidativo sob déficit de O₂, é plausível devido ao papel das ROS e das RNS (*Reactive Nitrogen Species*) na sinalização da indução das respostas adaptativas, tais como o controle do estado energético e da respiração; e, considerando a alta reatividade das mesmas, inevitavelmente resulta em danos oxidativos (Blokhina e Fagerstedt, 2010). Para mitigá-los, mecanismos regulatórios da produção e remoção de ROS e RNS são necessários (Blokhina et al., 2003, Blokhina e Fagerstedt, 2010).

Diferente da COX (Citocromo c oxidase; EC: 1.9.3.1), cujo K_m varia entre 0,08-0,16 μM (Hoshi et al., 1993) e que pode aumentar para mais de 1μM devido à inibição por NO (Cooper, 2002), e como consequência diminuir a respiração (Blokhina e Fagerstedt, 2010), o K_m da AOX é em torno de 10 μM (Millar et al., 1994; Affourtit et al., 2001), o que limita a função da AOX sob baixas tensões de O₂ (Igamberdiev e Hill, 2009). Porém, Gupta et al. (2009) assim como Rasmusson et al. (2009) sugerem que a função da AOX é prevenir a super-redução da ubiquinona sob condições de estresse, e o aumentada expressão e da atividade catalítica da AOX sob hipoxia é um mecanismo de prevenção contra a produção excessiva de ROS e RNS durante a re-oxigenação. Sabe-se que a AOX é reprimida em nível de transcritos, proteínas e atividade catalítica quando há baixa disponibilidade de piruvato (Oliver et al., 2008), e induzida em nível de transcritos ao aumento de NO (Huang et al., 2002). Nas plantas do presente estudo, o aumento progressivo e acentuado da expressão da AOX ao longo das 28h de hipoxia (Tabela 2) indica a possibilidade da modulação por esses metabólitos com base também na observação da indução da fermentação alcoólica e do ciclo Hb/NO, assim como papel importante da AOX em amenizar a produção excessiva de ROS e RNS sob reoxigenação.

Dos genes do sistema antioxidativo aqui analisados, a APX foi reprimida e a CAT foi muito pouco responsiva (ED baixa ou ausente) à hipoxia (Tabela 2). Em plântulas de soja recém-germinadas, transcritos, proteínas e a atividade da APX2 (EC: 1.11.1.11) foram fortemente reprimidos após três dias de hipoxia (Shi et al., 2008). E, em raízes de soja, também ocorreu repressão em nível de proteínas para a peroxidase após três e sete dias de encharcamento do solo; e apenas no sétimo dia de estresse foi detectado peroxidação lipídica e aumento de H₂O₂ (Alam et al., 2010). Esses resultados são similares aos observados no genótipo sensível, e opostos no genótipo tolerante de feijão guandu (*Cajanus cajan*

L. Halls), em que apresentou maior atividade catalítica, inclusive da catalase (EC: 1.11.1.6), após seis dias sob encharcamento do solo (Kumutha et al. 2009). Porém, em outras espécies também tolerantes, como *Populus trichocarpa*, foi observada a repressão em nível de transcritos para a APX (Kreuzwieser et al., 2009), e em arroz, a repressão transcricional da CAT (Lasanthi-Kudahettige et al., 2007). Isto pode ser uma indicação do controle genético diferencial dos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo entre as diferentes espécies. Pode-se supor que a repressão transcricional da APX favoreça o direcionamento do ascorbato para o uso da MDHAR (*Monodehydroascorbate Reductase*) (EC: 1.6.5.4) na redução da nsHB(Fe³⁺) em nsHB(Fe²⁺), importante para manter a conversão do NO em nitrato (Igamberdiev e Hill, 2009). Já a CAT, apesar de pouco responsiva à hipoxia em nossas avaliações, seus transcritos são abundantes em ambas as condições de disponibilidade de O₂, considerando o seu elevado K_m e *turnover* (K_{cat}), além de não precisar de um redutor para converter H₂O₂ em H₂O e O₂ (Mhamdi et al., 2010), pode favorecer a via de sinalização do H₂O₂ e controlar o aumento excessivo do mesmo, além de renovar O₂.

As plantas não possuem ortólogo do HIF1 α (*Hypoxia inducible factor* α , - subunidade de um fator de transcrição heterodimérico que regula a aclimação ao déficit de O₂), mas sim da P4H (EC: 1.14.11.2) (Vlad et al., 2007), que nos animais controla HIF1 α pós-traducionalmente, funcionando como um sensor direto da disponibilidade de O₂ (Guzy e Schumacker, 2006). Em *Arabidopsis* super-expressando P4H1 foi observado respostas típicas de hipoxia mesmo sob normoxia, como, por exemplo, a indução transcricional da ADH, SUS e NR, e repressão da peroxidase, apesar de ter reprimido AOX (Asif et al., 2009). Os nossos resultados em soja (Tabela 2), assim como os observados em milho (Zou et al., 2010) mostram que ortólogo da AtP4H1 apresenta baixa ED positiva em nível de transcritos, ao passo que em *Populus trichocarpa* (Kreuzwieser et al., 2009) é mais induzido; amostra do contraste entre espécies sensíveis e tolerante ao alagamento.

Em *Arabidopsis*, das 11 isoformas da AtTPS, apenas a AtTPS1 (EC: 2.4.1.15) tem atividade catalítica (Blázquez et al., 1998; Ramon et al., 2009). Porém, estudos (Brenner et al., 2005; Baena-González et al., 2007; Osuna et al., 2007; Üsadel et al., 2008) indicam que as demais isoformas tenham outra função, ainda desconhecida, no controle energético. Nossos resultados em soja mostram que a homóloga da AtTPS11 (Glyma17g07530) foi reprimida consideravelmente após 28h de

hipoxia (-4,3X, BR 4; -5,7X Embrapa 45) (Tabela 2). Repressão da TPS11, em *Arabidopsis* sob hipoxia, também foi visto por Liu et al. (2005); ao passo que a homóloga da AtTPS11 foi induzida e a da AtTPS5 foi reprimida em *Populus trichocarpa* (Kreuzwieser et al., 2009); amostragem de resultados contrastantes entre espécies tolerantes e sensíveis ao alagamento. Em *Arabidopsis*, Zhang et al. (2009) evidenciaram que o aumento da T6P (Trealose-6-fosfato) inibe a atividade catalítica da snRK1 ([*Sucrose non-fermenting-related Kinases 1*] integrante da família das quinases Ser/Thr independentes de cálcio) (EC: 2.7.11.1), resultando na repressão da AtTPS11 e indução da AtTPS5 transcricionalmente, e que resposta inversa também ocorre com a diminuição da concentração da T6P. Assim, sugere-se que AtTPS11 pode ser utilizado como gene marcador da ação da enzima snRK1 e indicar a abundância de T6P disponível. A snRK1 reprime genes envolvidos em processos consumidores de energia e induz processos catabólicos (Baena-González et al., 2007, Zhang et al., 2009), agindo como um roteador (Halford e Hey, 2009) na interface entre a regulação metabólica e a sinalização de diferentes estresses (Coello et al., 2011). Sabe-se que a snRK1 pode agir diretamente, a exemplo na fosforilação da NR e da TPS, que podem ser posteriormente inibidas através da ligação com a proteína 14-3-3 (Coello et al., 2011), assim como indiretamente, ativando fatores de transcrição responsáveis pela indução da expressão de genes como a SUSY (Purcell et al., 1998). Sugere-se também regulação pós-traducional da SUSY (fosforilação/defosforilação) através de quinases tanto dependentes quanto independentes da Ca^{2+} (Duncan et al., 2006), o que pode estar relacionado à maior relação de SUSY solúveis/associadas à membrana quando sob hipoxia (Bologa et al., 2003), intensificando o direcionamento de substratos para a glicólise ao invés de para a biossíntese da parede celular, gerando saldo positivo de ATPs. Lee et al. (2009) mostraram que a enzima CIPK15 (*Oryza sativa calcineurin B-like interacting protein kinase*) regula *aupstream* a snRK1, ligando a sinalização do déficit de O_2 à cascata de sinalização do metabolismo energético, como observado na modulação da expressão da α -amilase e da ADH em sementes de arroz sob hipoxia. Estas informações sugerem a participação da enzima snRK1 no controle da expressão dos genes SUSY, NR, TPS e ADH aqui estudados.

Conclusões

Em raízes de ambas as cultivares de soja, a hipoxia resultou na superexpressão dos genes ADH e AOX, e em maior intensidade na cultivar sensível (BR 4). Essa superexpressão pode estar relacionada ao possível aumento na concentração de piruvato, visto que o controle genético das vias da SUSY e da INV se mostra ineficiente. Outro fator sugerido na contribuição para a alta expressão da ADH e da AOX, e também da nsHB, é o não recrutamento de genes do sistema antioxidativo, favorecendo a geração de ROS e RNS sob hipoxia, aqui representado pela repressão da APX e pela insensibilidade da CAT à hipoxia, contribuindo na intensificação da via de sinalização do H₂O₂.

De um modo geral, quando comparado a outras espécies vegetais, o perfil transcricional dos genes aqui estudados em raízes de soja sob hipoxia mostra-se mais parecido ao observado em espécies sensíveis ao alagamento do que em espécies tolerantes. Essas diferenças nas respostas ao déficit de O₂ ocorrem tanto para genes alvos, que codificam enzimas pertencentes a diferentes rotas metabólicas, quanto para o gene da P4H, responsável no controle pós-traducional de diversas proteínas entre as quais codificadas por genes aqui estudados.

Referências

- Affourtit, C., Krab, K., Moore, A.L., 2001. Control of plant mitochondrial respiration. *Bioch. Biophys. Acta* 1504, 58-69.
- Alam, I., Lee, D., Kim, K., Park, C., Sharmin, S.A., Lee, H., Oh, K., Yun, B., Lee, B., 2010. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. *J. Biosci.* 35(1): 49-62.
- Allègre, A., Silvestre, J., Morard, P., Kallerhoff, J., Pinelli, E., 2004. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *J. Exp. Bot.* 55, 2625-2634.
- Armstrong, W., Drew, M.C., 2002. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel Y, Eshel A and Kafkafi U, eds. *Plant roots: the hidden half*, 3rd edn. New York: Marcel Dekker, 729-761.
- Asif, M.H., Trivedi, P.K., Misra, P., Nath, P., 2009. Prolyl-4-hydroxylase (AtP4H1) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. *Funct. Integr. Genomics* 9, 525-535.

- Avigad, G., 1982. Sucrose and other disaccharides. In TA Loewus, WTanner, eds, Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag, Heidelberg, 217-347.
- Bai, T., Li, C., Ma, F., Feng, F., Shu, H., 2010. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. Plant Soil 327, 95-105.
- Bailey-Serres, j., Voeselek, L.A.C.J., 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 313-339.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Sheen, J., 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. Nature 448, 938-942.
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C.L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J., Gancedo, C., 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Plant J. 13, 685-689.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage And Oxygen Deprivation Stress: A Review. Ann. Bot. 91, 179-194.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. Plant Physiol. Biochem. 48, 359-373.
- Bologa, K.L., Fernie, A.R., Leisse, A., Loureiro, M.E., Geigenberger, P., 2003. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. Plant Physiol. 132, 2058-2072.
- Branco-Price, C., Kaiser, K.A., Jang, C.J., Larive, C.K., Bailey-Serres J., 2008. Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 56, 743-755.
- Brandão, A.D., Sodek, L., 2009. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean plants under oxygen deficiency. Braz. J. Plant Physiol. 21(1), 13-23.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L., Schmölling, T., 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. Plant J. 44, 314-333.
- Byfield, G.E., Xue, H., Upchurch, R.G. Two Genes from Soybean Encoding Soluble $\Delta 9$ Stearoyl-ACP Desaturases. Crop Sci. 46, 840-84.
- Coello, P., Hey, S.J., Halford, N.G., 2011. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. J. Exp.Bot. 62(3) 883-893.
- Colmer, T.D., Voeselek, L.A.C.J., 2009. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. Funct. Plant Biol. 36, 665-681.
- Duncan, K.A., Hardin, S.C., Huber, S.C., 2006. The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation. Plant Cell Physiol. 47, 959-971.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T., Pennington, J.S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop Sci. 11, 929-931.

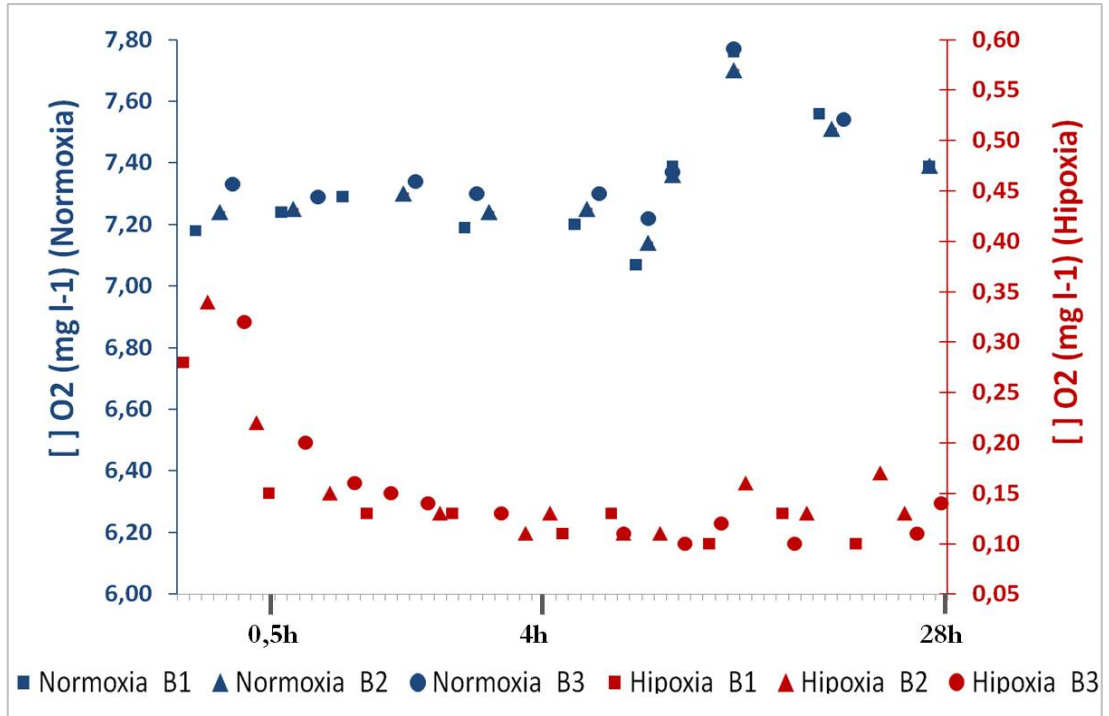
- Fukao, T., Bailey-Serres, J., 2008. Ethylene—A key regulator of submergence responses in rice. *Plant Sci.* 175, 43-51.
- Geigenberger, P., 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Op. In Plant Biol.* 6, 247-256.
- Gupta, K.J., Zabalza, A., van Dongen, J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol. Plant.* 137, 383-391.
- Guzy, R.D., Schumacker, P.T., 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91, 807-19.
- Halford, N.G., HEY, S.J., 2009. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* 419, 247-259.
- Hewitt, E.J., 1963. Mineral nutrition of plants in culture media. In: Stewart FC (ed) *Plant Physiology*. Academic Press, New York, 97-134.
- Hoshi, Y., Hazeki, O., Tamura, M., 1993. Oxygen dependence of redox state of copper in cytochrome oxidase in vitro. *J. Appl. Physiol.* 74, 1622-1627.
- Huang, X., von Rad, U., Durner, J., 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 215, 914-923.
- Igamberdiev, A.U., HILL, R.D., 2004. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J. Exp. Bot.* 55: 2473-2482.
- Jian, B., Liu, B., Bi, Y., Hou, W., Wu, C., Han, T., 2008. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 9, 59.
- Komatsu, S., Yamamoto, R., Nanjo, Y., Mikami, Y., Yunokawa, H., Sakata, K., 2009. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *J Proteome Res* 8:4766-4778.
- Komatsu, S., Sugimoto, T., Hoshino, T., Nanjo, Y., Furukawa, K., 2010a. Identification of flooding stress responsible cascades in root and hypocotyls of soybean using proteome analysis. *Amino Acids* 38:729-738.
- Komatsu, S., Kobayashi, Y., Nishizawa, K., Nanjo, Y., Furukawa, K., 2010b. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. DOI 10.1007/s00726-010-0608-1.
- Kreuzwieser, J., F urniss, S., Rennenberg, H., 2002. Impact of waterlogging on the N-metabolism of flood tolerant and non-tolerant tree species. *Plant Cell Environ.* 25, 1039-1049.
- Kreuzwieser, J., Hauberg, J., Howell, K.A., Carroll, A., Rennenberg, H., Millar, A.H., Whelan, J., 2009. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiol.* 149, 461-473.
- Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Deshmukh, P.S., Meena, R.C., 2009. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biol. Plant.* 53(1), 75-84.

- Laanbroek, H.J., 2010. Methane emission from natural wetlands: interplay between emergent macrophytes and soil microbial processes. *Ann. Bot.* 105: 141-153.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal Wand Clustal X version 2.0. *Bioinf.* 23: 2947-2948.
- Lasanthi-Kudahettige, R., Magneschi, L., Loreti, E., Gonzali, S., Licausi, F., Novi, G., Beretta, O., Vitulli, F., Alpi, A., Perata, P., 2007. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. *Plant Physiol.* 144, 218-231.
- Lee, K.W., Chen, P.W., Lu, C.A., Chen, S., Ho, T.H.D., Yu, S.M., 2009. Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci. Sign.* 2, ra61.
- Liu, F., VanToai, T., Moy, L.P., Bock, G., Linford, L.D., Quackenbush, J., 2005. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 1115-1129.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G., 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J. Exp. Bot.* 61(15), 4197-4220.
- Millar, A.H., Bergensen, F.J., Day, D.A., 1994. Oxygen affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol. Bioch.* 32, 847-852.
- Narsai, R., Howell, K.A., Carroll, A., Ivanova, A., Millar, A.H., Whelan, J., 2009. Defining Core Metabolic and Transcriptomic Responses to Oxygen Availability in Rice Embryos and Young Seedlings. *Plant Physiol.* 151, 306-322.
- Oliver, S.N., Lunn, J.E., Urbanczyk-Wochniak, E., Lytovchenko, A., van Dongen, J.T., Faix, B., Schmäzlin, E., Fernie, A.R., Geigenberger, P., 2008. Decreased Expression of Cytosolic Pyruvate Kinase in Potato Tubers Leads to a Decline in Pyruvate Resulting in an in Vivo Repression of the Alternative Oxidase. *Plant Physiol.* 148, 1640-1654.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Blasinska, O. E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W. R., and Stitt, M., 2007. Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 49, 463-491.
- Parolin, P., Wittmann, F., 2010. Struggle in the flood: tree responses to flooding stress in four tropical floodplain systems. *AoB Plants*. doi:10.1093/aobpla/plq003.
- Purcell, P. C., Smith, A. M., Halford, N. G., 1998. Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J.* 14, 195-202.
- Ramon, M., De Smet, I., Vandesteene, L., Naudts, M., Leyman, B., P, Van Dijck, P., Rolland, F., Beeckman, T., and Thevelein, J.M., 2009. Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 32, 1015-1032.
- Rasmusson, A.G., Fernie, A.R., van Dongen, J.T., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol. Plant.* 137, 371-382.

- Rhine, M.D., Stevens, G., Shannon, G., Wrather, A., Sleper, D. 2010. Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean Cultivars. *Irrig. Sci.* 28:135-142.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., van Dongen, J.T., 2010. Glycolysis and the TCA-cycle are linked by Alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 152, 1501-1513.
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., 2009. Waterlogging tolerance: nonsymbiotic haemoglobin-nitric oxide homeostasis and antioxidants. *Curr. Sci.*, 96 (5).
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A., 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463(7278),178-83.
- Setter, T.L., Waters, I., Sharma, S. K., Singh, K.N., Kulshreshtha, N., Yaduvanshi N.P.S., Ram, P.C., Singh, B.N., Rane, J., McDonald, G., Khabaz-Saberi, H., Biddulph, T.B., Wilson, R., Barclay, I., McLean, R., Cakir, M. 2009. Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Ann. Bot.* 103: 221-235.
- Shi, F., Yamamoto, R., Shimamura, S., Hiraga, S., Nakayama, N., Nakamura, T., Yukawa, K., Hachinohe, M., Matsumoto, H., Komatsu, S., 2008. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytoch.* 69, 1295-1303.
- Stoimenova, M., Hänsch, R., Mendel, R., Gimmler, H., Kaiser, W.M., 2003. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity. *Plant Soil* 253, 155-167.
- Stoimenova, M., Igamberdiev, A.U., Gupta, K.J., Hill, R.D., 2007. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* 226, 465-474.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P., Huala, E., 2008. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res* 36,D1009-1014.
- Trethewey, R.N., Geigenberger, P., Riedel, K., Hajirezaei, M.R., Sonnewald, U., Stitt, M., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., 1998. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J.* 15, 109-118.
- Unger, I.M., Motavalli, P.P., Muzika, R.M., 2009. Changes in soil chemical properties with flooding: A field laboratory approach. *Agr. Ecos. Environ.* 131 (2009) 105-110.

- Üsadel, B., Bläsing, O.E., Gibon, Y., Poree, F., Hohne, M., Gunter, M., Trethewey, R., Kamlage, B., Poorter, H., Stitt, M., 2008. Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant Cell Environ.* 31, 518-547.
- van Dongen, J.T., Fröhlich, A., Ramírez-Aguilar, S.J., Schauer, N., Fernie, A.R., Erban, A., Kopka, J., Clark, J., Langer, A., Geigenberger, P., 2009. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. *Ann. Bot.* 103, 269-280.
- Verhoeven, J.T.A., Setter, T.L., 2010. Agricultural use of wetlands: opportunities and limitations. *Ann. Bot.* 105: 155-163.
- Vlad, F., Spano, T., Vlad, D., Daher, F.B., Ouelhadj, A., Fragkostefanakis, S., Kalaitzis, P., 2007. Involvement of *Arabidopsis* prolyl 4 hydroxylases in hypoxia, anoxia and mechanical wounding. *Plant Signal Behav.* 2, 368-369.
- Zabalza, A., van Dongen, J.T., Fröhlich, A., Oliver, S.N., Faix, B., Gupta, K.J., Schmäzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M., Geigenberger, P., 2009. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol.* 149, 1087-1098.
- Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A., Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149, 1860-1871.
- Zou, X., Jiang, Y., Liu, L., Zhang, Z., Zheng, Y., 2010. Identification of transcriptome induced in roots of maize seedlings at the late stage of waterlogging. *BMC Plant Biol.* 10:189.
- Ye, J., McGinnis, S., Madden, T.L., 2006. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34, W6-W9.

Figura 1 - Concentração de O₂ (mg l⁻¹) na solução nutritiva borbulhada com ar atmosférico (em azul) e com gás nitrogênio (em vermelho).



B1: Bloco 1, B2: Bloco 2, B3: Bloco 3.

Tabela 1. Descrição dos genes de soja para análise de qPCR

Mecanismo Envolvido	Gene	Loco	Arabidopsis	
			Loco Homólogo	Descrição
Fermentação	ADH ^a	Glyma04g41990	AT1G77120	Álcool desidrogenase 1
		Glyma06g12780	AT1G77120	
Catabolismo da Sacarose	SUSY	Glyma13g17420	AT3G43190	Sintase da sacarose 4
	INV ^a	Glyma10g35890	AT4G09510	Invertase citosólica 2
		Glyma20g31730	AT4G09510	
Ciclo Hb/NO	NR	Glyma06g11430	AT1G77760	Nitrato redutase 1
	nsHB	Glyma11g12980	AT2G16060	Hemoglobina não-simbionte 1
Prevenção e Detoxicação de ROS	AOX	Glyma04g14800	AT3G22370	Oxidase alternativa 1a
	CAT	Glyma06g02040	AT4G35090	Catalase 2
	APX	Glyma12g07780	AT1G07890	Ascorbato peroxidase 1
Sinalização	P4H	Glyma10g44480	AT2G43080	Prolina-4-hidroxilase 1
	TPS	Glyma17g07530	AT2G18700	Trealose-6-fosfato sintase 11

^a Amplificação de duas isoformas dos genes ADH e nINV; demais genes, amplificação de apenas uma isoforma.

Tabela 2. Expressão diferencial dos genes via qPCR

Gene	Sequência do primer (5'-3')	[nM]	E%	Expressão					
				BR 4			Embrapa 45		
				0,5h	4h	28h	0,5h	4h	28h
ADH	F: CCTGTGAGGGACTGAGTTCTCTTC	300	90,0	37,8 ^a	167,4 ^a	85,1 ^a	36,0 ^a	103,4 ^a	48,0 ^a
	R: ACAGCAGCAAAGGTCCTATCATTCT	300							
nsHB	F: TGA AAC CAC CCT C C T C T T A G A C T C C	60	88,5	2,8 ^a	78,0 ^a	25,6 ^a	S.A.	S.A.	S.A.
	R: GAATGCGAAACACTTCCCAACC	60							
SUSY	F: TGTGTTGTCATGATTTGGATCTTG	60	99,9	1,2 ^c	3,1 ^a	2,4 ^a	-	4,4 ^a	1,7 ^a
	R: CACGGCTTAAAATTGAATTGATGG	60							
AOX	F: CTTCTGGGGTATTTGTTGTCACCT	300	91,5	1,7 ^a	6,1 ^a	141,3 ^a	-	2,6 ^a	48,8 ^a
	R: ATTGCCCTTGCCAGCTCCTTA	300							
APX	F: CACGGTGCCATAATATTCTCTC	300	91,7	-1,4 ^a	-2,4 ^a	-2,3 ^a	-	-1,8 ^a	-3,2 ^a
	R: CAACCAACTCCAATCATCATCAC	300							
TPS	F: TGCGTAACAGCAATCTTTCAACAA	200	97,5	-	-1,6 ^c	-4,3 ^a	-	-	-5,7 ^a
	R: CCCAAGACCTAATCCACCAACC	200							
NR	F: AATCCCATGCAAGCTCATCTCC	60	84,9	1,8 ^a	1,9 ^a	-1,8 ^a	1,5 ^b	1,6 ^c	-
	R: CAAACCCATGAGTAGGTCGTCG	60							
INV	F: TCTTGGTGATCCCTTCCTCGT	200	86,3	1,3 ^a	1,4 ^b	1,3 ^b	-	1,4 ^b	-1,4 ^b
	R: ATGAAGCCAGTCTCAGCAGCAG	200							
CAT	F: TCGATCAATTTGAAAGA ACTTATCCA	100	90,8	-	-	1,6 ^a	-	-	-
	R: ATACAAACGGCATTATTGAGATAGC	100							
P4H	F: GAATAGTGTGCATGGAGGATGTGAG	100	91,3	-	1,2 ^c	1,4 ^a	-	1,3 ^a	-
	R: TCTTGAGTCACACCGCACAAGAT	100							

A análise das expressões (abundância de transcritos hipoxia x normoxia para cada tempo, em cada cultivar) foi realizada pelo software REST 2009 (Qiagen), normalização da expressão (β -ACTINA + ELF1B), n=3000. Verde: *threshold* > 2, Vermelho: *threshold* < -2. S.A.: sem sinal de amplificação.

^a P(H1) ≤ 0,001; ^b P(H1) < 0,01; ^c P(H1) < 0,05. "-": sem significância estatística.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, L.; SODEK, L. Water logging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, 50: 405-410, 2006.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, 64: 5245-5250, 2004.
- ARMSTRONG, W. **Aeration in higher plants**. In: Woolhouse HW, ed. *Advances in botanical research*, Vol. 7. New York: Academic Press, 225-232, 1979.
- ARMSTRONG, W.; BECKETT, P.M. Internal aeration and the development of stelar anoxia in submerged roots. A multishelled mathematical model combining axial diffusion of oxygen in the cortex with radial losses to the stele, the wall layers and the rhizosphere. **New Phytologist**, 105: 221-245, 1987.
- ARMSTRONG, W.; ARMSTRONG, J.; BECKETT, P. M. Measurement and modelling of oxygen release from roots of *Phragmites australis*. In: **The Use of Constructed Wetlands in Water Pollution Control** (eds P. Cooper & B. C. Finklater), Oxford, UK.: Pergamon Press. 1990. 41-54.
- ARMSTRONG, J. et al. Pathways of aeration and the mechanisms and beneficial effects of humidity and venturi-induced convections in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. **Aquatic Botany**, 54: 177-197, 1996.
- ARMSTRONG, W. et al. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. **Annals of Botany**, 86: 687-703, 2000.
- ARMSTRONG, W.; DREW, M.C. 2002. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, eds. *Roots the hidden half*, 3rd edn. New York: Marcel Dekker Inc., 729-761.
- ARTICO, S. et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, 10:49, 2010.
- ASIF, M. H. et al. Prolyl-4-hydroxylase (AtP4H1) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. **Functional integrative genomics**, 9: 525-535, 2009.
- BAI, T. et al. Responses of growth and antioxidant system to root-zone hypoxia stress in two *Malus* species. **Plant Soil**, 327: 95-105, 2010.

BAILEY-SERRES, J.; CHANG, R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. **Annals of Botany**, 96:507-518, 2005.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, 59: 313-339, 2008.

BANTI, V. et al. Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, 31: 1029-1037, 2008.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage And Oxygen Deprivation Stress: A Review. **Annals of Botany**, 91: 179-194, 2003.

BLOM, C. W. P. M., VOESENEK, L. A. C. J. Flooding: the survival strategies of plants. **Tree**, 11, 7: 290-295, 1996.

BÖHM-HOFSTÄTTER, H.; TSCHERNUTTER, M.; KUNERT, R. Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87: 419-425, 2010.

BORU, G.; VANTOAI, T.; ALVES, J.; HUA, D.; KNEE, M. Responses of soybean to oxygen deficiency and elevated root-zone carbon dioxide concentration. **Annals of Botany**, 91: 447-453, 2003.

BOTREL, A; MAGNE, C; KAISER, W. M. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, 34: 645-652, 1996.

BOUMA, T. J. et al. Estimating respiration of roots in soil: interaction with soil CO₂, soil temperature and soil water. **Plant and Soil**, 195: 221-132, 1997.

BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, 4: 14, 2004.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, 218: 443-448, 1982.

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

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, 29: 23-39, 2002.

CAPONE, R.; TIWARI, B. S.; LEVINE, A., Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 425-428, 2004.

CHABBI, A.; McKEE, K.L.; MENDELSSOHN, I. A. Fate of oxygen losses from *Typha domingensis* (Typhaceae) and *Cladium jamaicense* (Cyperaceae) and consequences for root metabolism. **American Journal of Botany**, 87: 1081-1090, 2000.

CHANG, W. W. P. et al. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, 122: 295-318, 2000.

CHRISTIANSON, J. A. et al. Global Gene Expression Responses to Waterlogging in Roots and Leaves of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant & Cell Physiology**, 5, 1: 21-37, 2010.

CLARK, L. H.; HARRIS, W. H. Observations on the root anatomy of rice (*Oryza sativa* L.). **American Journal of Botany**, 68: 154-161, 1981.

COLMER, T. D. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deepwater rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, 91: 301-309, 2003.

COUEE, I. et al. Effects of anoxia on mitochondrial biogenesis in rice shoots - modification of in organello translation characteristics. **Plant Physiology**, 98: 411-421, 1992.

DE CARVALHO, M.C.C.G. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata*. **Biologia Plantarum**, 52: 771-774, 2008.

DE SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Environmental and Experimental Botany**, 50: 1-8, 2003.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, 51, 342: 89-97, 2000.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, 50: 227-230, 2010.

DREW, M. C.; Lynch, J. M. Soil anaerobiosis, microorganisms and root function. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 37-66, 1980.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Plant Molecular Biology**, 48: 223-250, 1997.

EBLE, C. F.; PIERCE, B. S.; GRADY, W. C. Palynology, petrography and geochemistry of the Sewickley coal bed (Monongahela Group, Late Pennsylvanian), Northern Appalachian Basin, USA. **International Journal of Coal Geology**, 55: 187-204, 2003.

ENGELAAR, W. M. H. G. et al. Root porosities and radial oxygen losses of *Rumex* and *Plantago* species as influenced by soil pore diameter and soil aeration. **New Phytologist**, 125: 565-574, 1993.

ERNST, W. H. O. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. **Aquatic Botany**, 38: 73-90, 1990.

FAN, T. W.; HIGASHI, R. M.; LANE, A. N. An in vivo ^1H and ^{31}P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 266: 592-606, 1988.

FOX, T. C.; KENNEDY, R. A. Mitochondrial enzymes in aerobically and anaerobically germinated seedlings of *Echinochloa* and rice. **Planta**, 184: 510-514, 1991.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Ethylene A key regulator of submergence responses in rice. **Plant Science**, 175: 43-51, 2008.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, 55(402): 1445-1454, 2004.

GEIGENBERGER, P. et al. Metabolic Activity Decreases as an Adaptive Response to Low Internal Oxygen in Growing Potato Tubers. **Biological Chemistry**, 381: 723-740, 2000.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, 6: 247-256, 2003.

GHARBI, I. et al. Increased hexose transport in the roots of tomato plants submitted to prolonged hypoxia. **Planta**, 230: 44-448, 2009.

GITHIRI, S. M. et al. QTL analysis of flooding tolerance in soybean at an early vegetative growth stage. **Plant Breeding**, 125: 613-618, 2006.

GIULIETTI, A. et al. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods**, 25: 386-401, 2001.

GUZY, R. D; SCHUMACKER, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. **Experimental Physiology**, 91: 807-19, 2006.

GUPTA, K. J; ZABALZA, A.; VAN DONGEN, J. T. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. **Physiologia Plantarum**, 137: 383-391, 2009.

GUTKNECHT, J. L. M.; GOODMAN, R. M.; BALSER, T. C. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. **Plant Soil**, 289: 17-34, 2006.

HANSON, A. D.; JACOBSON, J. V. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis and α -amylase by O₂ deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, 75: 566-572, 1984.

HODGSON, A. S.; CHAN, K. Y. The effect of short-term waterlogging during furrow irrigation on cotton in a cracking grey clay. **Australian Journal of Agricultural Research**, 33: 109-116, 1982.

HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, 10: 93, 2009.

IGAMBERDIEV, A. U.; HILL, R. D. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. **Journal of Experimental Botany**, 55: 2473-2482, 2004.

IGAMBERDIEV, A. U. et al. The haemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. **Annals of Botany**, 96: 557-564, 2005.

IGAMBERDIEV, A. U.; HILL, R. U. plant mitochondrial function during anaerobiosis. **Annals of Botany**, 103: 259-268, 2009.

JACKSON, M. B.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology**, 1: 274-287, 1999.

JUSTIN, S. F. W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, 105: 465-495, 1987.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, 84: 1204-1209, 1992.

KIRK, G. J. D.; SOLIVAS, J. L.; ALBERTO, M. C. Effects of flooding and redox conditions on solute diffusion in soil. **European Journal of Soil Science**, 54: 617-624, 2003.

KREUZWIESER, J. et al. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. **Plant Physiology**, 149: 461-473, 2009.

KOCH, M. S.; MENDELSSOHN, J. A. Sulphide as a soil phytotoxin: differential responses *in two* marsh species. **Journal of Ecology**, 77: 565-578, 1989.

LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. et al. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, 144: 218-231, 2007.

LINKEMER, G.; BOARD, J. E.; MUSGRAVE, M. E. Waterlogging effect on growth and yield components of late-planted soybean. **Crop Science**, 38: 1576-1584, 1998.

LIU F. Global transcription profiling reveals novel insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 137: 1115-1129, 2005.

LORETI, E. et al. Genome-wide analysis of gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. **Plant Physiology**. 137: 1130-1138, 2005.

McDONALD, M. P.; GALWEY, N. W.; COLMER, T. D. Similarity and diversity in adventitious root anatomy as related to root aeration among a range of wet- and dry-land grass species. **Plant, Cell and Environment**, 25: 441-451, 2002.

MAGALHÃES, P. C. et al. Avaliação dos ciclos de seleção da variedade BRS 4154 - Saracura para tolerância ao encharcamento do solo. 2005. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 67).

MALIK, A. I. et al. Aerenchyma formation and radial O₂ loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O₂-deficiency. **Plant, Cell & Environment**, 26: 1713-1722, 2003.

MANO, Y. et al. Variation for root aerenchyma formation in flooded and non-flooded maize and teosinte seedlings. **Plant Soil**, 281: 269-279, 2006.

MARCHEZAN, E. et al. Produção animal em várzea sistematizada cultivada com forrageiras de estação fria submetidas a diferentes níveis de adubação. **Ciência Rural**, 32: 303-308, 2002.

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Crop Statistics Section 2004: Statistics of Agriculture, Forestry and Fisheries (in Japanese) [Online]. Available at: <http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/daizu2003a-2/daizu2003a-2.pdf>. MAFF Crop Statistics Section, Tokyo, Japan.

MIYASHITA, Y. et al. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 49: 1108-1121, 2007.

MØLLER, I. M. The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, 100: 85-90, 1997.

NAKAYAMA, N. The effect of flooding stress at the germination stage on the growth of soybean in relation to initial seed moisture content (Japanese). **JAPANESE JOURNAL OF CROP SCIENCE**, 74: 325-329, 2004.

OLSON, D. C.; OETIKER, J. H.; YANG, S. F. Analysis of *LE-ACS3*, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 14056-14061, 1995.

PEZESHKI, S.R. Wetland plant responses to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, 46: 299-312, 2001.

PLANCHET, E.; KAISER, W. M. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **Journal of Experimental Botany**, 57: 3043-3055, 2006.

PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, 24: 29-95, 1972.

RASMUSSEN, A. G.; GEISLER, D. A.; MØLLER, I. M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. **Mitochondrion**, 8: 47-60, 2008.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 23: 145-151, 2009.

REIS, J.C.L. Pastagens em Terras Baixas. Circular Técnica, EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado, Pelotas, 35p. 1998.

RHINE, M. D. et al. Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean Cultivars. **Irrigation Science**. 28: 135-142, 2010.

RHOADS, D, M. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, 141: 357-366, 2006.

RICHTER, C. Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. **Bioscience Reports**, 17: 53-66, 1997.

ROBERTS, J. K. M. et al. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. **Proceeding of National Academy of Sciences of the USA**, 81: 3379-3383, 1984.

ROBERTS, T. H.; FREDLUND, K. M.; MØLLER, I. M. Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. **FEBS Letters**, 373: 307-309, 1995.

ROCHA, M. et al. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicas*. **Plant Physiology**, 152: 1501-1513, 2010.

RUSSELL, D. A.; WONG, D. M.-L.; SACHS, M. M. The Anaerobic Response of Soybean. **Plant Physiology**, 92: 401-407, 1990.

SACHS, M. M.; FREELING, M.; OKOMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, 20: 761-767, 1980.

SACHS, M. M.; SUBBAIAH, C. C.; SAAB, I. N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, 47: 1-15, 1996.

SAIRAM, R. K. et al. Physiology and biochemistry of waterlogging in plants. **Biologia Plantarum**, 52: 401-412, 2008.

SAIRAM, R. K.; KUMUTHA, D.; EZHILMATHI, K. Waterlogging tolerance: nonsymbiotic haemoglobin-nitric oxide homeostasis and antioxidants. **Current Science**, 96(5): 674-682, 2009.

SAIRAM, R. K. et al. Waterlogging-induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mung bean (*Vigna radiata*). **Journal of Plant Physiology**, 166: 602-616, 2009.

SCHUMACKER, P. T. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Critical Care Medicine**, 33(12): S423-S425, 2005.

SCOTT, H.D. et al. Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, 81:631-636, 1989.

SCOTT, H.D. et al. Influence of temporary flooding at three growth stages on soybean growth on a clayey soil. **Journal of Plant Nutrition**, 13: 1045-1071, 1990.

SEAGO, J. L. et al. A re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma. **Annals of Botany**, 96: 565-579, 2005.

SETTER, T. L.; WATERS, I. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat barley and oats. **Plant and Soil**, 253: 1-34, 2003.

SETTER, T. L. et al. Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. **Annals of Botany**, 137: 1-15, 2009.

SHI, F. et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, 69: 1295-1303, 2008.

SHIMAMURA, S. et al. Stem hypertrophic lenticels and secondary aerenchyma enable oxygen transport to roots of soybean in flooded soil. **Annals of Botany**, 106: 277-284, 2010.

SILVA, C. A. S. da et al. Drenagem superficial para cultivos rotacionados em solos de várzea. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 22 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 237).

SIONIT, N.; KRAMER, P.J. Effects of water stress during different stages of growth of soybean. **Agronomy Journal**, 69: 274-278, 1977.

STEFFENS, B.; WANG, J.; SAUTER, M. Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. **Planta**, 223: 604-612, 2006.

STITT, M. Pyrophosphate as an alternative energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. **Botanica Acta**, 111: 167-175, 1998.

STOIMENOVA, M. et al. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, 226: 465-474, 2007.

SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca^{2+} signal in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiology**, 118: 759-771, 1998.

SUN, H.; TRUMPOWER, B. L. Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 419: 198-206, 2003.

SUNG, J.M. The effect of sub-optimal O_2 on seedling emergence of soybean seeds of different seed size. **Seed Science and Technology**, 23: 807-814, 1995.

TEAKLE, N. L. et al. *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O_2 transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na^+ transport. **Physiologia Plantarum**, 139: 358-374, 2010.

THEISEN, G. et al. Ação de regulador do metabolismo de etileno sobre a produtividade de soja cultivada em terras baixas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 15p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 68).

THOMAS, A. L.; GUERREIRO, S. M. C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, 96: 1191-1198, 2005.

VAN DONGEN, J. T. et al. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. **Annals of Botany**, 103: 269-280, 2009.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3: 1-11, 2002.

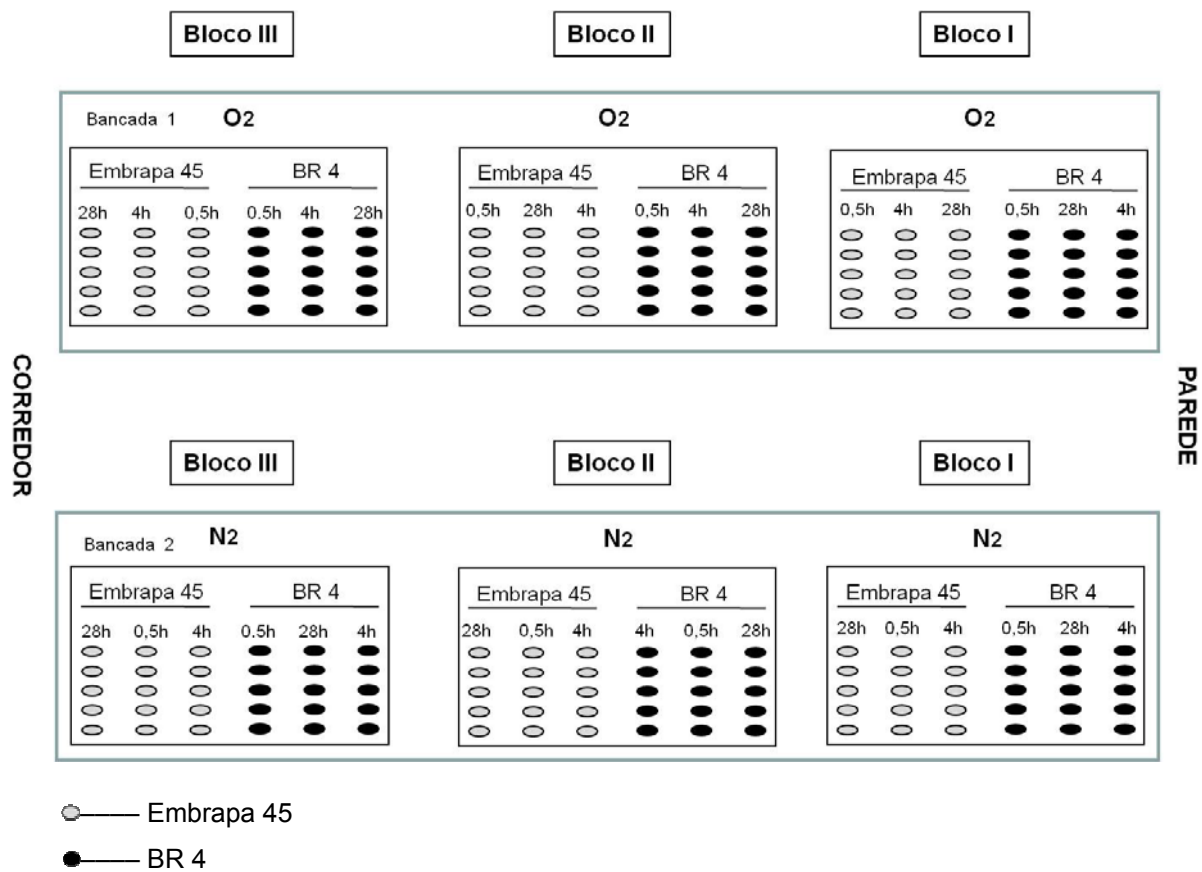
VANTOAI, T.T., HOA, T.T.C., HUE, N.T.N., NGUYEN, H.T., SHANNON, J.G., RAHMAN, M.A. Flooding Tolerance of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Germplasm from Southeast Asia under Field and Screen-House Environments. **The Open Agriculture Journal**, 4; 38-46, 2010.

- VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, 79: 3-20, 1997.
- VISSER, E. J. W. et al. Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentration. **Plant, Cell and Environment**, 20: 647-653, 1997.
- VISSER, E. J. W. et al. Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. **Plant, Cell and Environment**, 23: 1237-1245, 2000.
- VODNIKA, D. et al. Respiratory potential of maize (*Zea mays* L.) roots exposed to hypoxia. **Environmental and Experimental Botany**, 65: 107-110, 2009.
- ZABALZA, A. et al. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. **Plant Physiology** 149: 1087-1098, 2009.
- ZENG, Y. et al. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional regulation. **Plant Physiology**, 116: 1573-1583, 1998.
- ZENG, Y. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, 121: 599-608, 1999.
- WIENGWEERA, A.; GREENWAY, H.; THOMSON; C.J. The use of agar nutrient solution to simulate lack of convection in waterlogged soils. **Annals of Botany**, 80: 115-123, 1997.

ANEXOS

ANEXO A

Delimitação experimental para a coleta do material biológico.



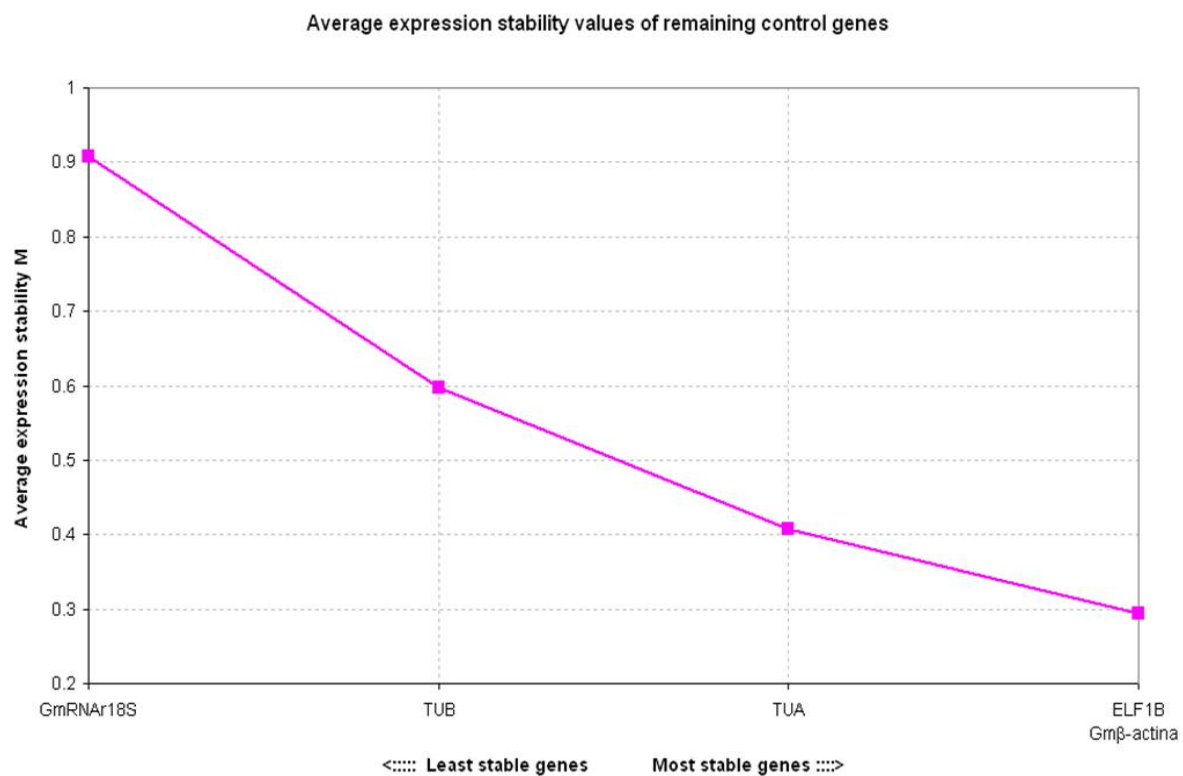
ANEXO B

Anexo B - Estabilidade de expressão dos genes candidatos referência para normalização da expressão de genes de interesse, calculada pelo algoritmo NormFinder.

Classificação	Genes	Valor de Estabilidade	Melhor Combinação	Valor de Estabilidade
1	β -actina	0,098	ELF1B e	0,071
2	ELF1B	0,124	β -actina	
3	TUA	0,192		
4	TUB	0,593		
5	RNAr18S	0,767		

ANEXO C

Valores médios de estabilidade de expressão (M) e classificação dos genes candidatos referência para normalização da expressão de genes de interesse, calculada pelo algoritmo geNorm



Determinação do número ótimo de genes referência para a normalização da expressão de genes de interesse.

