



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ LUÍS HARTMANN CARANHATO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA EM
GENÓTIPOS DE SOJA COM A INTROGRESSÃO DA
CONSTRUÇÃO *35S-AtAREB1***

Londrina
2018

ANDRÉ LUÍS HARTMANN CARANHATO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA EM
GENÓTIPOS DE SOJA COM A INTROGRESSÃO DA
CONSTRUÇÃO *35S-AtAREB1***

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

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Coorientador: Carlos Lásaro Pereira de Melo.

Londrina
2018

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

Caranhato, André Luís Hartmann.

CHARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA EM GENÓTIPOS DE SOJA COM A INTROGRESSÃO DA CONSTRUÇÃO 35S-AtAREB1 / André Luís Hartmann Caranhato. - Londrina, 2018.
65 f.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Coorientador: Carlos Lásaro Pereira de Melo.

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

Inclui bibliografia.

1. Soja - Tese. 2. Déficit Hídrico - Tese. 3. Genética - Tese. 4. Melhoramento - Tese. I. Nepomuceno, Alexandre Lima . II. Melo, Carlos Lásaro Pereira de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

ANDRÉ LUÍS HARTMANN CARANHATO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FISIOLÓGICA EM GENÓTIPOS
DE SOJA COM A INTROGRESSÃO DA CONSTRUÇÃO *35S-AtAREB1***

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

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Lásaro Pereira de Melo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EMBRAPA - Soja

Dr^a. Liliane Marcia Mertz-Henning
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EMBRAPA - Soja

Dr. José Salvador Simoneti Foloni
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EMBRAPA - Soja

Londrina, 27 de Julho de 2018.

*Dedico este trabalho aos meus pais (Tânia Maisa Hartmann e Diniz Caranhato)
Por estarem sempre ao meu lado, dando-me apoio e força
em cada nova etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade

À Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja pela oportunidade, pelo espaço e condições necessárias oferecidas a minha pessoa para a realização deste trabalho;

A Deus, por sempre estar ao meu lado, guiando-me ao longo desta jornada;

Aos meus pais Tânia Maisa Hartmann e Diniz Caranhato, pelo apoio incondicional dispensado durante toda a minha vida;

À Patricia Braga, por estar ao meu lado nesta caminhada, sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso;

Aos meus orientadores, Dr. Alexandre Lima Nepomuceno e Dr. Carlos Lásaro Pereira de Melo, por terem me aceito como seu orientado durante esta etapa da minha vida e por todos os ensinamentos e conselhos fornecidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

A todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e à equipe de Ecofisiologia da Embrapa Soja, por todo o apoio fornecido na realização deste trabalho;

A todos os meus amigos e amigas que estiveram comigo nesta caminhada;

CARANHATO, André Luís Hartmann. **Caracterização molecular e fisiológica em genótipos de soja com a introgressão da construção 35S-AtAREB1**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada uma importante *commoditie* em todo o mundo, sendo o Brasil, o segundo maior produtor mundial, com produção total estimada em 113.00 milhões de toneladas para a safra 2017/18. A seca, é considerada o principal estresse abiótico que atinge as lavouras em todo o mundo. A característica de tolerância à seca é controlada por diversos genes e os fatores de transcrição, são genes com a capacidade de controlar a expressão de diversos genes estresse-induzidos. O fator de transcrição AREB1 (*Aba Responsive Element Binding*- elemento de ligação de resposta ao ABA) está envolvido na via de sinalização ABA (ácido abscísico) e diversos trabalhos já relacionaram maior tolerância ao déficit hídrico em plantas geneticamente modificadas (GM) com esta construção. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as respostas moleculares e fisiológicas em novos genótipos de soja com a introgressão da construção 35S-AtAREB1, submetidos ao déficit hídrico. Os resultados indicaram que o genótipo 1Ea2939 e suas respectivas linhagens 16-T0005 e 16-T0010, apresentaram melhor performance nos experimentos e nas análises realizadas. Ao final do período de cinco dias de déficit hídrico, as linhagens GM apresentaram maiores níveis de condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética, além de uma porcentagem maior de água disponível no substrato. Juntamente com análises moleculares, estes resultados sugerem que os genótipos GM possam ter ativado mecanismos para o evitamento da seca, a partir da manutenção das trocas gasosas, de forma a permitir que a planta perca uma quantidade menor de água para o ambiente ao longo do tempo e como consequência, que ocorra uma maior conservação da água disponível no substrato.

Palavras-chave: *Glycine max*. Déficit hídrico. Organismos geneticamente modificados.

CARANHATO, André Luís Hartmann. **Molecular and physiological characterization in soybean genotypes with the introgression of the 35S-AtAREB1 construct.** 2018. 65 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is considered an important commodity worldwide, which Brazil being the second largest producer in the world, with a total estimated production of 113.00 million tons for 2017/18 crop season. Drought is considered the main abiotic stress affecting crops worldwide. The characteristic of drought tolerance is controlled by several genes and the transcription factors are genes with the ability to control the expression of several stress-induced genes. The transcription factor AREB1 (Aba Responsive Element Binding) is involved in the ABA (abscisic acid) signaling pathway and several studies have related a higher tolerance to water deficit in genetically modified (GM) plants with this construct. In this context, the present work aimed to evaluate the molecular and physiological responses in new soybean genotypes containing the introgression of 35S-AtAREB1 genetic construction, under water deficit conditions. The results indicated that the 1Ea2939 genotype and their respective lines 16-T0005 and 16-T0010, showed better performance in the experiments and the analyzes performed. At the end of five days of drought period, GM strains showed higher levels of stomatal conductance, transpiration and photosynthesis, besides a higher percentage of available water in the substrate. Together with molecular analyzes, these results suggest that GM genotypes may have activated drought avoidance mechanisms from the maintenance of gaseous exchanges in order to allow the plant to lose a smaller amount of water to the environment over time and as a consequence, a greater conservation of available water in the substrate occurs.

Keywords: *Glycine max*. Drought stress. Genetically modified organism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Dados de condutância estomática** ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os genótipos 1Ea2939; e 16T-0005; 16T-0010; BMX-DESAFIO RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).33
- Figura 2. Comparação da Fotossíntese** ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).34
- Figura 3. Comparação da Concentração Interna de CO_2** ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).35
- Figura 4. Dados de Teor Relativo de Água** (%) entre os genótipos GM 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).35
- Figura 5. Dados de transpiração** ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para os genótipos GM 1Ea2939; e convencionais 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra

minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	36
Figura 6. Comparação da Temperatura Foliar (C°) (TLEAF) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	37
Figura 7. Dados de Umidade Gravimétrica do Solo (%) obtidos para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).	38
Figura 8. Correlação entre as medidas fisiológicas, fotossíntese (A), condutância estomática (Gs), conteúdo interno de CO₂, temperatura foliar (Tleaf), transpiração (Trans) e teor relativo de água (TRA), e a umidade gravimétrica do solo (UGS). ns: não significativo ($p > 0.05$); * significativo a 5%; ** significativo a 1%; *** significativo a 0.1% pelo teste de Pearson.....	39
Figura 9. Dados de altura de plantas (cm) para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle - C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	40
Figura 10. Número de nós amostrados para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	41
Figura 11. Comparação do número de vagens com sementes entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).	41

- Figura 12. Número de vagens sem sementes** para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).42
- Figura 13. Número total de sementes viáveis** para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).43
- Figura 14. Peso total de grãos (g)** para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).43
- Figura 15. Expressão gênica normalizada do gene AtAREB1A**, nas condições DH e C para os genótipos 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 em comparação ao genótipo calibrador GM 1Ea2939. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX.44
- Figura 16. Expressão gênica normalizada do transgene AtAREB1A**, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas, normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.45
- Figura 17. Expressão gênica normalizada do gene GmRAB18**, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.46
- Figura 18. Expressão gênica normalizada do gene GmSnRK**, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir

de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.....47

Figura 19. Expressão gênica normalizada do gene GmPP2C, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.....48

Figura 20. Expressão gênica normalizada do gene HSP, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.....49

Figura 21. Expressão gênica normalizada do gene Dehydrina, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.....50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genótipos (genitores femininos) utilizados nos cruzamentos com o genótipo GM 1Ea2939 (genitor masculino) e suas respectivas populações F1 obtidas26
- Tabela 2.** Análise de segregação do gene AtAREB1 nas linhas híbridas de soja obtidas a partir de cruzamentos realizados entre a linhagem GM 1Ea2939 e genótipos convencionais de soja (BR12-511, BR11-2794, BR12-1780, LS93-0375, LD04-132605, BRR16-381010, BMX Desafio RR, BRR16-381010A e BMX Desafio RR)32
- Tabela 3.** Dados de Umidade Gravimétrica do Solo (%) nas condições hídricas Controle - C e Déficit Hídrico – DH38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	A Soja	15
2.1.1	Origem e Dispersão	15
2.1.2	Importância econômica	16
2.2	O Déficit Hídrico	17
2.2.1	Estratégias de Tolerância a Seca	18
2.3	Genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico	19
2.4	Os Fatores de Transcrição AREB	20
2.5	Melhoramento Genético	21
2.6	Biotecnologia Vegetal	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Material Vegetal	25
4.2	Obtenção dos Híbridos	25
4.2	Avaliação da Segregação	26
4.3	Experimento de Respostas Fisiológicas	26
4.4	Experimento de Respostas Fisiológicas	28
4.5	Análise da Expressão de Genes via RT-qPCR	30
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	58
8.	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais oleaginosas cultivadas no mundo. Sua importância não é resultado apenas da produção de óleo e da ração usada para alimentação de animais na pecuária, mas também como proteína para a alimentação humana e como matéria prima para a produção de biocombustíveis (MASUDA; GOLDSMITH, 2009). Diversos fatores bióticos e abióticos, no entanto, podem afetar negativamente a produtividade agrícola não apenas em locais específicos, mas em todo o mundo. Dentre eles o déficit hídrico é o fator abiótico determinante, sendo considerado um dos principais responsáveis pela redução da produção em diversas culturas.

Diversos fatores são responsáveis pelo incremento da escassez de água no planeta. As mudanças climáticas, juntamente com o aumento da população mundial adicionam componentes significativos no cenário agrícola. Como medida para mitigar os prejuízos causados pela seca e também para suprir a demanda de alimentos, o desenvolvimento de variedades de soja que apresentem maior tolerância ao déficit hídrico é de fundamental importância.

A característica de tolerância ao déficit hídrico é complexa, percebida através de respostas fisiológicas, morfológicas e anatômicas das plantas, as quais são controladas pela expressão de diversos genes (HU; XIONG, 2014). Dentre os mecanismos seca-responsivos, o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) é responsável por induzir o fechamento estomático e, conseqüentemente, reduzir a perda de água pela transpiração e assim promover o uso eficiente da água pela planta, resultando em maior quantidade de água disponível no solo.

Estudos têm elucidado a importância de proteínas AREB1 e bZIP em promover o aumento da tolerância ao déficit hídrico (FUJITA et al., 2011; GAO et al., 2011). Barbosa et al. (2013), demonstraram em seus experimentos que plantas de soja, transformadas com a construção *35S:AtAREB1*, apresentaram melhores taxas de sobrevivência e menor dano foliar após cinco dias de déficit hídrico. Utilizando a mesma construção genética, Marinho et al. (2016), avaliaram genótipos de soja na condição controle e sob déficit hídrico e, dentre as plantas avaliadas, o genótipo Geneticamente Modificado (GM) 1Ea2939, quando comparado ao seu respectivo *background* genético, a cultivar convencional BR16, que apresentou mecanismos de

conservação de água pela redução da condutância estomática em condição de baixa disponibilidade hídrica, além de maior número total de vagens e sementes, sugerindo que a expressão constitutiva do gene *AtAREB1* promove aumento da capacidade vegetal de tolerar a seca, sem comprometimento da produtividade. Ainda, em condições de campo, a linhagem GM *AtAREB1A* 1Ea2939 apresentou maior uso intrínseco da água, maior índice de área foliar e maior rendimento em comparação aos demais eventos GMs e cultivares convencionais de soja (FUGANTI-PAGLIARINI et al, 2017). Estes resultados mostraram que a inserção do Fator de Transcrição (FT) *AtAREB1A*, em soja, aumentou a tolerância à seca nas plantas.

Assim, considerando-se os cenários agrícolas futuros de escassez de água, o desenvolvimento de novas cultivares que ativem mecanismos para minimizar os efeitos da seca é uma importante ferramenta para a manutenção e o incremento da produção nacional. Neste contexto, o melhoramento genético, juntamente com a biotecnologia, representam uma estratégia eficiente no desenvolvimento destas cultivares. Cabe ressaltar que linhagem GM 1Ea2939 foi obtida no *background* genético da cultivar BR16, bastante antiga e com baixa produtividade, se comparada às cultivares disponíveis atualmente. Portanto, introgridir o gene *AtAREB1* em cultivares mais modernas, mais adaptadas às diferentes regiões produtoras e com maior produtividade constitui um passo importante na obtenção de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico as quais serão mais facilmente aceitas pelos produtores, sem perdas de produtividade. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar genótipos de soja, obtidos a partir de cruzamentos entre a linhagem GM 1Ea2939, contendo a construção gênica 35S:*AtAREB1*, e cultivares modernas de soja, quanto às respostas fisiológicas e moleculares, em condições de déficit hídrico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A Soja

2.1.1 Origem e Dispersão

A origem da soja (*Glycine max* L. Merrill) é incerta, no entanto diversos autores afirmam que a sua domesticação ocorreu a partir da soja selvagem (*Glycine soja*) no continente asiático (HYMOWITZ, 1970). O seu cultivo e consumo ficou, portanto restrito à Ásia por milhares de anos, até que no século XVIII ocorreu a importação de exemplares para jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha (QIU; CHANG, 2010).

O grão foi cultivado nos Estados Unidos (EUA) pela primeira vez por volta de 1765, mas apenas após a segunda década do século XX, a indústria mundial começou a se interessar pelos teores de óleo e proteínas presentes no grão. Em 1927, pesquisadores dos EUA foram enviados para países do continente asiático para coletar diversas amostras de germoplasma de soja e, a partir destas amostras, originaram-se os primeiros parentais utilizados no melhoramento de soja nos EUA (SINGH, 2010).

No Brasil, os primeiros testes com a cultura foram realizados com algumas variedades no estado da Bahia, no ano de 1882. A partir desta data, foram realizados diversos estudos em diferentes locais no país, onde a cultura encontrou condições favoráveis para uma rápida expansão. Na região Sul do País, a soja foi bem aceita pelos produtores, pois essa região apresentava um clima mais adequado ao cultivo e por ser uma cultura de verão, permitia a sucessão com a cultura do trigo, que era a principal atividade da região na época (BONATO; BONATO, 1987).

Estas características, juntamente com o grande aumento do preço da soja no mercado mundial em 1970, despertaram o interesse dos agricultores e também do governo, resultando em investimentos que permitiram a “tropicalização” da cultura, principalmente devido ao melhoramento genético, com a descoberta de genes responsáveis pelo período juvenil longo (MIYASAKA et al., 1970), que permitiu o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às regiões de baixa latitude, impactando enormemente na produção brasileira do grão (BONATO; BONATO, 1987).

Nas últimas três décadas, a soja tornou-se uma das principais espécies agrônômicas cultivadas no mundo, com uma área de cultivo mundial e brasileira, projetada em, aproximadamente, 126 milhões de hectares e 35 milhões de hectares, respectivamente, na safra 2017/2018 (USDA, 2018).

2.1.2 Importância econômica

Atualmente, a soja é uma importante *commodity* agrícola, sendo que, a produção mundial para a safra 2016/2017 foi de, aproximadamente, 348 milhões de toneladas (USDA, 2018). Segundo Hirakuri e Lazzarotto. (2014), existem diversos fatores que são responsáveis pela grande demanda mundial do grão, dentre as principais, podem-se destacar o alto teor de proteínas (40%) e óleo (20%), e também a alta oferta de tecnologias, que permite ampliar a área produzida e a produtividade. Além disso, o grão é cultivado e negociado em diversos países, o que facilita a sua comercialização.

Nesta safra 2017/18, a previsão, é de que os cinco maiores produtores mundiais sejam Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia com uma produção estimada para estes países respectivamente de, 119,52; 113; 47, 14,2; 9,5 milhões de toneladas (USDA, 2018). No Brasil a cultura da soja tem um importante papel socioeconômico, uma vez que movimenta um grande número de organizações, como empresas de pesquisa e desenvolvimento; fornecedores de insumos; indústria de máquinas e implementos; produtores; cooperativas; fábricas de ração; usinas de biodiesel; dentre outras.

A soja é o grão mais produzido no país, sendo que das 113 milhões de toneladas previstas para a safra 2017/18, cerca de 70,5 milhões serão destinadas para a exportação, tornando o país o maior exportador mundial desta *commodity*, seguido pelos Estados Unidos e Argentina com 56,2 e 6,8 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2018).

Apesar dos números positivos, o atual cenário global e as perspectivas de mudanças climáticas, com ocorrências de eventos de secas mais frequentes e intensos tem preocupado produtores e pesquisadores. Portanto, para minimizar os prejuízos da escassez de água é essencial o desenvolvimento de práticas que visem reduzir as perdas provocadas pelo déficit hídrico (DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2015). Neste contexto, o melhoramento genético e a engenharia genética são as

principais ferramentas utilizadas para o desenvolvimento de cultivares superiores, de forma que estas possam apresentar maior tolerância ao déficit hídrico (KIRIGA; YU; BILL, 2016).

2.2 O Déficit Hídrico

Existem diversos fatores bióticos e abióticos, que influenciam negativamente a produção agrícola. Diversos autores consideram o déficit hídrico, como o principal estresse abiótico para as plantas (KIRIGA; YU; BILL, 2016; TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001; YANG et al., 2010), principalmente pelos danos causados ao longo do desenvolvimento da cultura, mas também, pelos outros estresses que o acompanham, como altas temperaturas e deficiências nutricionais. A importância desta condição tende a se intensificar para a agricultura moderna, pois muitos estudos têm apontado que alterações climáticas provocadas, provavelmente, pelo aquecimento global, tendem a aumentar a incidência e a severidade dos eventos de seca ao longo dos próximos anos (HUGHES; DIAZ, 2008; LOBELL, 2007; SANTOS et al., 2011).

Daryanto et al. (2017) avaliaram publicações relacionadas com a influência da seca em diversas espécies de importância agrônômica, dentre os anos 1980 a 2015 e, a partir destas análises, os autores inferiram que na cultura da soja ocorre a perda de, aproximadamente, 30% da sua capacidade produtiva, quando sob redução de 40% da disponibilidade hídrica durante seu ciclo.

No Brasil, a seca é um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade. Por exemplo, na safra 2015/2016, houve uma redução de aproximadamente 9,7% da capacidade produtiva nacional devido a ocorrência de déficit hídrico (HIRAKURI, 2016). Já na Argentina, terceiro maior produtor mundial do grão, a previsão é que nesta safra (2017/18) ocorram em torno de 20% de perdas da produção sojícola total do país devido ao déficit hídrico (USDA, 2018). Além da redução de produtividade, os números também apontam prejuízos econômicos. Os valores acumulados em perdas decorrentes de períodos de déficit hídrico nos últimos anos (dados registrados a partir das safras 1976/77 até 2013/2014) alcançam a cifra de US\$ 79,62 bilhões (FERREIRA, 2016).

2.2.1 Estratégias de Tolerância a Seca

A disponibilidade hídrica é um dos principais limitantes para a produção agrícola mundial. Com as alterações climáticas provocadas pelo aquecimento global, projeções indicam um aumento na ocorrência e severidade de eventos de seca (ASSENG et al., 2009).

As plantas, sendo organismos sésseis, não possuem a capacidade de locomoção para evitar ambientes desfavoráveis. Devido a esta característica, desenvolveram diversos mecanismos morfológicos, bioquímicos e moleculares, para garantir sua sobrevivência, sob influência das adversidades ambientais (RAGHAVENDRA et al., 2010).

Dentre as respostas fisiológicas e morfológicas vegetais à condição de deficiência hídrica, pode-se destacar mecanismos como o florescimento precoce, de modo a completar o ciclo de vida mais rapidamente; a redução da perda de água, através do fechamento estomático ou do aumento da espessura da cutícula foliar; e o incremento da capacidade de absorção da água no solo, através do maior desenvolvimento radicular (HU; XIONG, 2014).

A ocorrência de eventos de seca durante o ciclo da cultura da soja acarreta grandes prejuízos, principalmente quando ocorre durante o estágio reprodutivo, sendo relativamente tolerado durante o estágio vegetativo (DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2017). Na fase inicial do estágio reprodutivo, quando a planta é mais sensível à falta d'água, a ocorrência de déficit hídrico resulta em abortamento floral e, conseqüentemente, em redução na produtividade final. No decorrer do estágio reprodutivo, a redução da produtividade ocorre em razão do encurtamento do ciclo de vida da planta, com o adiantamento do ciclo reprodutivo; a redução das ramificações e do número de vagens; e a redução do peso e número de grãos produzidos nas vagens (DARYANTO; WANG; JACINTHE, 2015).

Segundo Turner et al. (2001) a resistência à seca pelos vegetais pode ser classificada em três estratégias distintas: escape, evitamento e tolerância à seca. O escape, corresponde a regulação do ciclo da planta, como por exemplo o adiantamento do ciclo para completar o seu desenvolvimento durante o período em que ainda existe água disponível. A segunda classe, o evitamento, é caracterizado pela redução da perda de água por meio do fechamento estomático e da manutenção do turgor celular através da regulação osmótica. A abertura e o

fechamento estomático são regulados pelo ácido abscísico (ABA). Assim, sob baixa disponibilidade hídrica no solo, ocorre o aumento da concentração de ABA na folha, acarretando redução da condutância estomática (GALLARDO; TURNER; LUDWIG, 1994; HENSON; JENSEN; TURNER, 1989). Já a regulação osmótica é uma resposta ao déficit hídrico, onde ocorre o acúmulo de solutos pela planta para reduzir a perda de turgor celular, à medida que o potencial hídrico da planta diminui (MORGAN, 1984; TURNER; JONES, 1980; TURNER; WRIGHT; SIDDIQUE, 2001). A terceira classe, a tolerância à seca, é definida pela capacidade da planta em tolerar a seca, sendo ela capaz de manter o turgor celular e o seu metabolismo, por meio da tolerância protoplasmática e da síntese de osmoprotetores (MANAVALAN et al., 2009).

2.3 Genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico

Diversos estudos demonstram que os mecanismos de tolerância à seca, sejam eles moleculares ou fisiológicos, estão relacionados com diversos genes que apresentam múltiplas funções. Estes genes podem ter sua expressão induzida ou reprimida a partir do estresse por déficit hídrico (SEKI et al., 2007; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; VALLIYODAN et al., 2016; ZHU, 2002).

Segundo Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2006), os genes relacionados com a resposta a tolerância a seca podem ser classificados em dois grandes grupos. O primeiro grupo está relacionado com proteínas, que provavelmente, atuam na tolerância a estresses abióticos, sendo estas as chaperonas; proteínas de embriogenese tardia (LEA); osmotinas; proteínas anticongelantes e proteínas de ligação ao mRNA, havendo também enzimas relacionadas à biossíntese de osmólitos; canais de água; transporte de açúcares e prolínas; além de enzimas de desintoxicação e diversas proteases.

O segundo grupo de genes está relacionado com proteínas envolvidas na transdução do sinal e na expressão de genes responsivos ao estresse. Este grupo é composto por FT, proteínas quinases, fosfatases, proteínas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, dentre outras moléculas sinalizadoras (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Os FT são responsáveis pela ativação de uma cascata de genes que atuam juntos na resposta a vários tipos de estresses (BHATNAGAR-MATHUR; VADEZ;

SHARMA, 2008). Diversos FTs estão relacionados com a tolerância a seca (VINOCOUR; ALTMAN 2005; BARTELS; SUNKAR, 2005). A maioria destes fatores de transcrição estão distribuídos nas seguintes famílias: AP2/ERF (*APETALA2/Ethylene Response Factor*), bZIP (*Basic leucine Zipper domain*), NAC (*NAM, ATAF1, 2, e CUC2*), MYB (*Myeloblastosis oncogene*), MYC (*Myelocytomatosis oncogene*), Cis2His2 ZF (*Cistein2Histidin2Zinc-Finger*) e WRKY (*Amino acids W, R, K, Y*)(BHATNAGAR-MATHUR; VADEZ; SHARMA, 2008).

2.4 Os Fatores de Transcrição AREB

O hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) tem grande importância na regulação de diversos processos nas plantas, tais como dormência e germinação de sementes, fechamento estomático nas folhas e também tolerância ao estresse por seca (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002; HIMMELBACH; YANG; GRILL, 2003; YOSHIDA et al., 2010).

Vários estudos já reportaram à existência de muitos genes que apresentam resposta ao déficit hídrico e muitos destes genes são também induzidos pelo ABA (AGARWAL; JHA, 2010; BUSK; PAGÈS, 1998; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). A análise da região promotora de genes induzidos pelo ABA revelou uma região altamente conservada denominada de elemento responsivo ao ABA (ABRE; PyACGTGG/TC) (GIRAUDAT et al., 1994). Assim, utilizando as sequências ABRE como iscas, em uma triagem realizada em sistema híbrido simples de leveduras, proteínas de ligação responsivas ao ABA (*Aba Responsive Element Binding - AREB*) foram isoladas (CHOI et al., 2000; UNO et al., 2000). Estes FTs com domínios do tipo zíper de leucina básico (bZIP) compreendem a maior família de proteínas de ligação responsivas ao ABA, conhecidas até o momento (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2017).

Em *Arabidopsis thaliana* existem 75 bZIP FT AREB divididos em 11 grupos (grupo A ao S). O grupo A é composto por 9 homólogos no genoma de *Arabidopsis* sendo que AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF3 respondem principalmente à seca e à salinidade alta (CORRÊA et al., 2008). Yoshida et al. (2010) avaliaram os genes *AREB1*, *AREB2* e *ABF3* e confirmaram que estes fatores de transcrição são ativados pela presença do ABA. Utilizando mutantes triplos para estes genes e

através de análise do transcriptoma, os autores encontraram diversos genes que tiveram sua expressão alterada, sendo estes relacionados com a tolerância a estresses, tais como genes da classe de proteínas LEA, genes ABA-regulados e fatores de transcrição. Os autores também concluíram que os genes *AREB1*, *AREB2* e *ABF3* possuem sobreposição de função, pois conferem tolerância a seca, evidenciando que o uso de apenas um destes genes pode gerar resultados positivos na tolerância ao déficit hídrico.

Marinho et al. (2016) caracterizou molecularmente e fisiologicamente em condições de casa de vegetação, eventos de soja GM transformados com a construção *35S-AtAREB1*. Os autores observaram que os eventos GM apresentaram maior taxa de sobrevivência após um período de déficit hídrico extremo e apresentaram maior quantidade de água em seus substratos, indicando maior tolerância pelo mecanismo de evitamento à seca, principalmente em razão da redução da taxa de transpiração. Fuganti-Pagliarini et al. (2017) avaliou a resposta ao déficit hídrico em condições de campo, onde o evento 1Ea2939 apresentou resultados superiores em comparação com o seu *background* e outras linhagens GM.

2.5 Melhoramento Genético

O melhoramento genético de plantas teve início desde o primeiro momento em que um produtor escolheu e deu preferência a uma determinada planta ou semente, para o seu posterior cultivo e utilização (FEHR, 1991). E assim, os melhoristas vêm, ao longo de muitos anos, buscando selecionar plantas com características para atender às necessidades de uma determinada cultura e aumentar sua produtividade, uma vez que, atualmente o mundo passa por um rápido aumento da população mundial e com isso surge a necessidade de ampliar a capacidade produtiva de alimentos em quantidade e com qualidade, de forma eficiente e com o menor impacto ambiental possível.

Esse aumento da produção de alimentos passa, indubitavelmente, por duas vias, uma destas é o aumento da área cultivada e a outra, o aumento da capacidade produtiva em um mesmo espaço físico. As áreas passíveis de serem utilizadas para produção de alimentos possuem hoje um limite físico para sua expansão, tornando o

aumento da capacidade produtiva, o caminho mais viável para o incremento da produção mundial de alimentos (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 1999).

No Brasil, como já afirmado, a soja é uma das principais culturas agrícolas, colocando o país como segundo maior produtor mundial (USDA, 2018). Entretanto, para alcançar os atuais patamares de produção, foram necessários muitos anos de pesquisa e trabalho por parte de diversos melhoristas e instituições de pesquisas. Um importante marco para essa cultura no país foi a sua adaptação para o cultivo em regiões de baixa latitude e clima tropical com latitudes inferiores a 20°, principalmente pelo fato de a soja ser considerada uma planta de dias curtos (noites longas), o que fez com que essa cultura fosse cultivada principalmente em regiões com latitudes acima de 30° em condições de clima temperado (BONATO; BONATO., 1987).

Esta característica fez com que o início da introdução da cultura da soja no país, o seu cultivo ficasse restrito principalmente ao estado do Rio Grande do Sul. As tentativas de iniciar o cultivo do grão em regiões tropicais, onde durante o período de desenvolvimento da planta o fotoperíodo é curto, resultou na redução do período vegetativo e, conseqüentemente, em plantas de porte pequeno e redução da produtividade destas (ALMEIDA et al., 1999). Para contornar esta resposta ao dia curto, pesquisadores focaram na característica de período juvenil longo, buscando no germoplasma do grão, cultivares que apresentassem essa característica (DESTRO, 2001; HARTWIG; KIIHL, 1979; MIYASAKA et al., 1970; RAY et al., 1995), o que faz com que a soja não floresça no seu período juvenil, mesmo sob presença de fotoperíodo curto e, desta forma, a planta apresenta maior crescimento vegetativo. O uso desta característica permitiu que novas cultivares fossem obtidas para o cultivo em regiões com fotoperíodo curto, permitindo a adaptação da soja nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Esta foi apenas a primeira característica trabalhada pelos melhoristas. Desde então, o melhoramento genético da soja tem focado em atender às necessidades agrônômicas existentes em uma determinada região onde se deseja cultivar, tais como, maior resistência a doenças; fungos; nematoides; tolerância a déficit hídrico; aperfeiçoamento da parte física da planta, com plantas de maior tamanho, com maior produtividade de grãos, com maior desenvolvimento da parte radicular da planta, o que permite uma melhor penetração em solos compactados e melhor absorção dos nutrientes; além de maiores teores de óleo e proteína, dentre tantas outras características de interesse.

2.6 Biotecnologia Vegetal

Nos últimos anos, os avanços em biologia, bioquímica e principalmente em genética molecular, culminaram no surgimento de uma nova área de estudos conhecida como Biotecnologia. Os progressos obtidos nesta área permitiram a obtenção de novas recombinações gênicas, que antes não eram possíveis de ocorrer naturalmente. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs), abriu um novo patamar para os programas de melhoramento, possibilitando a obtenção de novas linhagens superiores, embora, sejam necessárias diversas etapas de caracterização e melhoramento clássico até a obtenção destas cultivares.

A partir de 1960, técnicas de engenharia genética permitiram a manipulação do DNA a nível molecular, possibilitando a retirada de genes específicos de um organismo (bactéria, planta ou animal) e posterior inserção destes em outros organismos (AHMAD et al., 2012). Em 1990, a China foi o primeiro país a permitir a comercialização de um produto geneticamente modificado, com o plantio de tabaco resistente ao vírus do mosaico (TMV- *tobacco mosaic virus*) (JAMES; KRATTIGER, 1996). Já o primeiro alimento geneticamente modificado liberado para a comercialização foi em 1994, nos Estados Unidos; um tomate da empresa Calgene denominado *Flavr Savr*TM, melhorado para impedir o amolecimento prematuro dos tomates, com maior tempo de prateleira e mais saboroso.

Desde então, a engenharia genética, em plantas, ganhou a atenção dos pesquisadores e interesse dos produtores. É uma tecnologia com aproximadamente 40 anos e desde o lançamento da primeira cultivar GM, a área global destinada ao cultivo de plantas GMs passou de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 185.1 milhões de hectares em 2016 (ISAAA, 2016).

A maioria das cultivares transgênicas comercializadas atualmente foram obtidas a partir de duas técnicas principais de inserção de DNA exógeno, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (método indireto) e a biobalística (método direto) (LIU; YUAN; STEWART, 2013). Dentre estas metodologias, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* apresenta diversas vantagens, como o baixo número de cópias transferidas e a expressão com maior previsibilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a segregação do gene *35S-AtAREB1* em novos genótipos de soja, provenientes de diferentes cruzamentos entre a linhagem GM 1Ea2939 e cultivares modernas de soja; caracterizar as respostas fisiológicas e moleculares destas linhas e determinar a estabilidade do transgene quando inserido em diferentes genótipos.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a segregação do gene *AtAREB1* em linhas provenientes de diferentes cruzamentos, fenotipicamente, considerando o uso do glufosinato de amônio como marcador e estabelecer a eficiência de seleção quando comparada à seleção pela análise molecular;
- Quantificar, em genótipos de soja oriundos de cruzamentos com o evento GM 1Ea2939, a expressão de genes da cascata de sinalização tais como *AtAreb1*, fosfatase *GmPP2C* (Glyma14g37480), quinase *GmSRK2* (Glyma02g15330), *GmRAB18* (Glyma09g31740), Deidrina (Glyma09G185500) em condições bem-irrigadas e sob déficit hídrico, via RT-qPCR;
- Avaliar os genótipos obtidos nas diferentes condições hídricas com relação a:
 - a) Medidas de parâmetros fisiológicos tais como taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, temperatura foliar, teor relativo de água, concentração intercelular de CO₂ e umidade gravimétrica do solo e;
 - b) Parâmetros de rendimento (por planta) tais como altura de plantas, número de nós, número de vagens com e sem sementes, número de sementes viáveis, massa seca de sementes viáveis.

4 METODOLOGIA

4.1 Material Vegetal

O Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, em parceria com o *Japan International Research Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS), obteve diversos eventos de soja GMs, a partir da transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, da cultivar convencional de soja BR 16, considerada sensível à seca (OYA et al., 2004).

O vetor pC3300J-35S:*AtAREB1* utilizado na obtenção da linhagem GM 1Ea2939 utilizada neste trabalho contém a região codante do gene *AtAREB1A*, isolado de *A. thaliana* e, como agente seletivo, o gene *bar* (*Streptomyces hygrosopicus*) (MURAKAMI et al., 1986), que codifica a enzima fosfithricin-N-acetiltransferase (PAT), conferindo resistência ao herbicida glufosinato-sal de amônio. Ambos os genes, alvo e marcador, estão sob o controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV*).

4.2 Obtenção dos Híbridos

Visando obter linhagens híbridas foram realizados diversos cruzamentos com o evento GM 1Ea2939 e genótipos de soja mais atuais. Sete populações de híbridos de soja foram obtidas (Tabela 1) a partir da hibridação, na safra 2015/2016, de cinco genótipos convencionais (BR12-511, BR11-2794, BR12-1780, LS93-0375, LD04-132605, BRR16-381010, BMX Desafio RR) e mais dois RR (Resistente ao Glifosato - BRR16-381010A e BMX Desafio RR) com o evento GM 1Ea2939. Estas populações tiveram a geração F₁ conduzidas em casa de vegetação, entre maio e agosto de 2016, e em outubro de 2016.

Tabela 1. Genótipos (genitores femininos) utilizados nos cruzamentos com o genótipo GM 1Ea2939 (genitor masculino) e suas respectivas populações F1 obtidas.

Genitor Feminino		Genitor Masculino	Populações F1
BR12-511	X	1Ea 2939	16T-0001
BR11-2794	x	1Ea 2939	16T-0002
BR12-1780	x	1Ea 2939	16T-0004
LS93-0375	x	1Ea 2939	16T-0005
LD04-13265	x	1Ea 2939	16T-0007
BRR16-381010A	x	1Ea 2939	16T-0008
BMX Desafio RR	x	1Ea 2939	16T-0010

Genótipos (genitores femininos) utilizados nos cruzamentos com o genótipo GM 1Ea2939 (genitor masculino) e suas respectivas populações F1 obtidas.

4.2 Avaliação da Segregação

Em casa de vegetação foram semeadas, em vasos contendo 5 kg de solo, sementes das sete populações, na geração F₂. Em cada vaso foram semeadas no máximo 10 sementes, totalizando 7.007 plantas com a soma de todas as populações (variando de 693 a 1078 plantas/população).

Durante a condução da geração F₂, no estágio de desenvolvimento V3 segundo Fehr et al. (1971), foi realizada a contagem do estande total de plantas de cada população e realizada a aplicação do herbicida glufosinato-sal de amônio (Finale®) na concentração de 200 g.L⁻¹ (dosagem comercial 1,5 L/ha) para seleção das linhas contendo a construção de interesse. Após a aplicação, as plantas sobreviventes foram contabilizadas e os dados submetidos à análise de segregação pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) ($p > 0,05$) para verificar qual a proporção genotípica esperada para o gene *bar* e, conseqüentemente, para o gene *AtAREB1*.

4.3 Experimento de Respostas Fisiológicas

Ao final da geração F₂ foi aplicada a metodologia de condução de populações *Single Pod Descended* (SPD), descendente de uma única vagem, onde foi colhida uma vagem por planta para dar origem as próximas gerações, então cada vagem coletada originou uma nova linhagem dentro do programa de melhoramento. Porém, devido ao grande número de linhagens obtidas, para a montagem dos experimentos de respostas fisiológicas foram escolhidas as populações 16T-0005 e 16T-0010,

pelo fato dos parentais femininos destas populações apresentarem características contrastantes com relação ao ciclo.

Dentro destas duas populações foram selecionadas, aleatoriamente, seis plantas para compor as linhagens da geração F₃. As sementes destas plantas foram semeadas em vasos com capacidade de 10 kg de substrato, para que compor a geração F₃ e para a multiplicação de sementes. Cada planta teve 12 sementes semeadas em três vasos, sendo plantadas 4 sementes em cada um.

As plantas que compuseram a geração F₃ deste experimento foram cultivadas da mesma maneira que as da geração anterior, sendo que no estágio de desenvolvimento V3 (Fehr et al., 1971), foi realizada a aplicação do herbicida glufosinato-sal de amônio. Nesta etapa, sete dias após a aplicação do herbicida, foram coletadas amostras de folha das plantas sobreviventes para a realização da extração de DNA, de acordo com o protocolo de extração adaptado de Doyle e Doyle (DOYLE; DICKSON, 1987) e confirmação da inserção do gene de interesse. Após a extração, as amostras foram submetidas a reação da polimerase em cadeia (PCR) com o primer AREB (Marinho et al., 2016), para confirmação da presença do transgene AREB1. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25µL, composta por tampão de reação 1X (Invitrogen), 0,2µM de cada primer *Forward* e *Reverse*, 0,4mM de dNTP's (Invitrogen), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen), 1U de TaqDNA polimerase (Invitrogen) e 3µL de cDNA. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Veriti®* (*Applied Biosystems, Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos*) e a ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s e finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com coloração por brometo de etídio (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS, 1989) e visualizados em transluminador de luz ultravioleta (UV) *Loccus* modelo L-PIX, as imagens foram capturadas digitalmente através do *software* L-PIX *Image EX*.

Após a análise dos produtos de PCR e a confirmação da presença do transgene de interesse, a composição da geração F₄ foi realizada pela seleção de uma linhagem de cada população.

4.4 Experimento de Respostas Fisiológicas

Para a análise das respostas fisiológicas das linhagens híbridas obtidas, foi instalado um experimento em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial duplo 6x2, sendo 6 genótipos (1Ea2939, linhagem 16T-0005; linhagem 16T-0010; LS93-0375; BMX-Desafio RR e BR16) e duas condições hídricas (Controle – C, e Déficit Hídrico - DH), com nove repetições.

As sementes colhidas da geração F₃ foram desinfestadas com solução de hipoclorito (10%), em seguida germinadas em papel Germitest® umedecido com água destilada na quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco e depois alocadas em câmara de germinação a 25°C com 100% de umidade relativa. Os papéis foram mantidos na câmara por 3 dias e, após este período, as plântulas mais vigorosas e homogêneas foram transferidas individualmente para vasos com capacidade volumétrica de 1 L (15 cm de diâmetro externo x 10 cm de base x 11 cm de altura), preenchidos com 1 Kg de mistura substrato:areia (1:1). O substrato utilizado foi constituído de mistura: terra:areia:composto orgânico na proporção 3:2:2, respectivamente. Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura programada a 28±2°C.

No estágio de desenvolvimento V₁ foram coletadas amostras de folhas de cada planta e realizada a extração de DNA, com base no protocolo de extração Doyle e Doyle. Novamente, após a extração do DNA genômico, foi realizado um PCR convencional nas amostras das plantas pertencentes ao genótipo GM 1Ea2939 e as respectivas linhagens F_{3:4}, oriundas do cruzamento com a 1Ea2939, para confirmação da presença do transgene.

Até o estágio de desenvolvimento V₄ todos os vasos foram irrigados diariamente e, neste ponto, foi iniciado o tratamento de déficit hídrico para as plantas do grupo tratado. Vale ressaltar que nesta etapa a cultivar LS93-0375 já se encontrava no estágio reprodutivo R₁, devido ao fato desta cultivar ser super-precoce (Grupo de maturação 4.2). Para o início do déficit hídrico, um dia antes da suspensão da irrigação, todos os vasos foram irrigados no período da tarde até atingirem a capacidade de campo para permitir a drenagem do excesso de água durante a noite. No outro dia pela manhã, os vasos foram ensacados com sacos plásticos, sendo estes amarrados até a região próxima do caule, e ali foi adicionado um pequeno maço de fibra sintética hidrofóbica (FERREIRA et al., 2015). Os vasos

correspondentes à condição C (controle), continuaram sendo irrigados diariamente com auxílio de uma seringa, sendo que os sacos plásticos destes vasos foram furados na região inferior para permitir a drenagem do excesso de água. Nos vasos do grupo DH (déficit hídrico) a irrigação foi suspensa e após cinco dias de tratamento foram realizadas as leituras e coletas.

A confirmação da indução do déficit hídrico foi realizada através de leituras da condutância estomática (g_s). Valores inferiores a $\leq 200 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foram considerados como determinantes para a condição de estresse por déficit hídrico e valores acima deste foram considerados para a condição C (FLEXAS; MEDRANO, 2002; SALINET, 2009). As leituras de condutância estomática, capacidade fotossintética, concentração interna de CO_2 , taxa transpirativa e TC° foliar realizadas neste experimento foram obtidas com o auxílio do analisador portátil de fotossíntese (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA) seguindo as seguintes condições: fonte de luz 90% vermelha +10% azul em câmara de 2 cm^2 , radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; referência de CO_2 em $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$; referência de água em $18\text{-}20 \text{ mmol mol}^{-1}$ e fluxo de CO_2 de $400 \mu\text{mol s}^{-1}$.

Para a análise do teor relativo de água (TRA) foram coletados três discos foliares de cada planta e, imediatamente, colocados em tubos com capacidade de 20 ml já previamente pesados (PP). Após a adição dos discos foliares, os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso fresco (PF), então foi adicionada água destilada e as amostras foram armazenadas em local escuro por 48h. Após este período os discos foliares foram retirados dos tubos e secados, cuidadosamente, em papel toalha, sendo então, novamente pesados para a determinação do peso turgido (PT). A partir deste ponto, os discos foliares foram levados para secagem em estufa a 60C° , por três dias. Após este período foram novamente pesados para a determinação do peso seco (PS). O cálculo para a determinação do TRA foi realizado utilizando a fórmula $TRA(\%) = \left\{ \left[\frac{PF-PS}{PT-PS} \right] * 100 \right\}$ baseado na metodologia descrita por Barrs e Weatherley, (1962).

A determinação da Umidade Gravimétrica do Solo (UGS) foi realizada imediatamente após a retirada do saco plástico de cada vaso. Coletou-se uma amostra homogênea de solo e esta foi acondicionada em potes de alumínio, previamente pesados e, posteriormente, foram seladas. Logo após a coleta, as

amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, onde foi realizada a pesagem do Peso Fresco (PF). Na sequência as amostras foram colocadas para secar em estufa $\pm 105\text{ C}^\circ$ durante 48h para a determinação do peso seco (PS). A UGS foi calculada pela seguinte fórmula $UGS (\%) = \left\{ \left[\frac{PF-PS}{PS} \right] * 100 \right\}$, segundo a metodologia descrita por Blake; Hartge, (1986).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Tukey e Dunet para comparação de médias, a 5 e 1% de probabilidade com o auxílio do programa SAS - sistema de análise estatística para microcomputadores (ZONTA; MACHADO, 1984).

4.5 Análise da Expressão de Genes via RT-qPCR

Para a análise dos níveis de expressão de genes relacionados à cascata ativada pelo fator de transcrição AREB1, foram coletadas amostras de folhas das plantas de soja sob déficit hídrico (nível de condutância estomática $\leq 200\ \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Imediatamente após a coleta, cada trifólio foi embalado em papel alumínio, seguido de imersão em nitrogênio líquido (-180 C°) e posterior armazenamento em Ultrafreezer (-80 C°).

Os trifólios foram macerados e aproximadamente $100\mu\text{g}$ foram acondicionadas em micro tubos do tipo Eppendorf 2ml. A extração de RNA foi realizada com reagente Trizol®, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, foi feita a verificação da integridade das amostras em gel de agarose 1% e posterior quantificação em Nanodrop. Após a quantificação, as amostras que apresentaram baixa integridade e/ou qualidade no RNA total extraído, foram refeitas. A purificação das amostras para a retirada de todo o DNA genômico contaminante foi realizada com o kit DNase TURBO™ (TURBO DNA-free Kit, Thermo Fisher Scientific, Reinach, Switzerland). Para confirmar a completa eliminação do DNA genômico das amostras, foi procedida uma reação de PCR com primers que amplificam o gene endógeno β -actina.

Para a síntese do cDNA foram utilizados cerca de $5\mu\text{g}$ dos RNAs totais de cada amostra, sendo a reação conduzida com o kit Superscript® III First Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen Life Technologies*). Após a conclusão da

síntese de cDNA, foi conduzida uma nova reação de PCR com *primers* que amplificam o gene da β -actina. Após a reação, em gel de agarose, foram observadas bandas com um tamanho de 80 pb menor que o controle positivo. Isto ocorre pois o cDNA não possui introns, o que resulta em uma banda menor que a do DNA genômico.

Além do fator de transcrição AtAREB1, os genes fosfatase *GmPP2C* (Glyma14g37480), quinase *GmSRK2* (Glyma02g15330), *GmRAB18* (Glyma09g31740) tiveram o nível de expressão quantificado em condição controle e sob déficit hídrico. Os primers utilizados na RT-qPCR foram desenhados com auxílio do programa *Primer Express* versão 3.0 (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), a partir das sequências disponíveis no Phytozome.

Para a quantificação do nível de expressão dos genes foram formados *bulks* de três repetições biológicas, a partir das nove repetições do experimento de respostas fisiológicas. As reações foram conduzidas em termociclador 7900 HT (*Applied Biosystems*) utilizando-se o *kit SYBR® Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), conforme as instruções do fabricante. Os genes FYVE (Glyma.13G114700) e NUDIX (Glyma.13G171900), foram utilizados como calibradores endógenos (MARCOLINO-GOMES et al., 2015).

A eficiência dos *primers* para a amplificação dos genes deste estudo foi estimada por meio de diluições seriadas de cDNAs (1x, 5x, 25x, 125x e 625x). Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas logo após o final de cada reação de quantificação. Na dissociação, os produtos de amplificação foram submetidos a temperaturas de 60 a 95°C.

Para calcular a eficiência da reação foi aplicada a fórmula: $E = \left[10 - \frac{1}{\text{slope}} \right] -$

1. A expressão gênica relativa foi determinada pela normalização com os genes referência FYVE e NUDIX para as plantas controle (C) e submetidas ao déficit hídrico (DH). A expressão foi calculada pelo método $2^{-(DCt)}$, onde $DCt = Ct_{\text{experimental}} - Ct_{\text{normalizador}}$.

5 RESULTADOS

5.1 Segregação do gene *AtAREB1* nas linhagens híbridas

As plantas de soja que sobreviveram à aplicação do herbicida foram contabilizadas e os dados submetidos à análise de segregação pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) ($p > 0,05$). Os valores encontrados de χ^2 para as sete populações, foram: 0,0012; 0,4592; 0,5440; 0,2971; 0,9101; 1,3815; 0,1649, indicando que as populações segregaram na proporção mendeliana de 3:1 (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de segregação do gene *AtAREB1* nas linhas híbridas de soja obtidas a partir de cruzamentos realizados entre a linhagem GM 1Ea2939 e genótipos convencionais de soja (BR12-511, BR11-2794, BR12-1780, LS93-0375, LD04-132605, BRR16-381010, BMX Desafio RR, BRR16-381010A e BMX Desafio RR).

Populações (Parentais)	Teste de Segregação por População			
	T ¹	O ²	E ³	χ^2
16T-0001 (BR12-511)	1068	802	801	0,0012
16T-0002 (BR11-2794)	1048	767	786	0,4592
16T-0004 (BR12-1780)	1030	752	772	0,5440
LS93-0375 (16T-0005)	1078	793	808	0,2971
16T-0007 (LD04-13265)	693	498	519	0,9107
16T-0008 (BRR16-381010A)	1067	767	800	1,3815
16T-0010 (BMX Desafio RR)	1023	756	767	0,1649

T¹: Estande Total de Plantas; O²: Frequência Observada; E³: Frequência Esperada; χ^2 : Qui-quadrado ($P > 0,05$).

5.2 Respostas fisiológicas

Os resultados da condutância estomática (g_s) (figura 1), mostraram que o evento GM 1Ea2939 apresentou menor taxa na condição C, em comparação aos demais genótipos. No entanto, na condição de DH (déficit hídrico), a g_s no evento GM foi de $0,20 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, diferindo estatisticamente de todos os demais; sendo seguida pelos genótipos 16T-0005 e 16T-0010 com 0,11 e 0,08, respectivamente, não diferindo entre si.

Os parentais BMX-Desafio RR e LS93-0375 e a cultivar convencional BR16 apresentaram grande redução na g_s na condição C, e valores bem abaixo dos demais genótipos na condição de DH, indicando que as plantas de soja sofreram um déficit hídrico considerado severo.

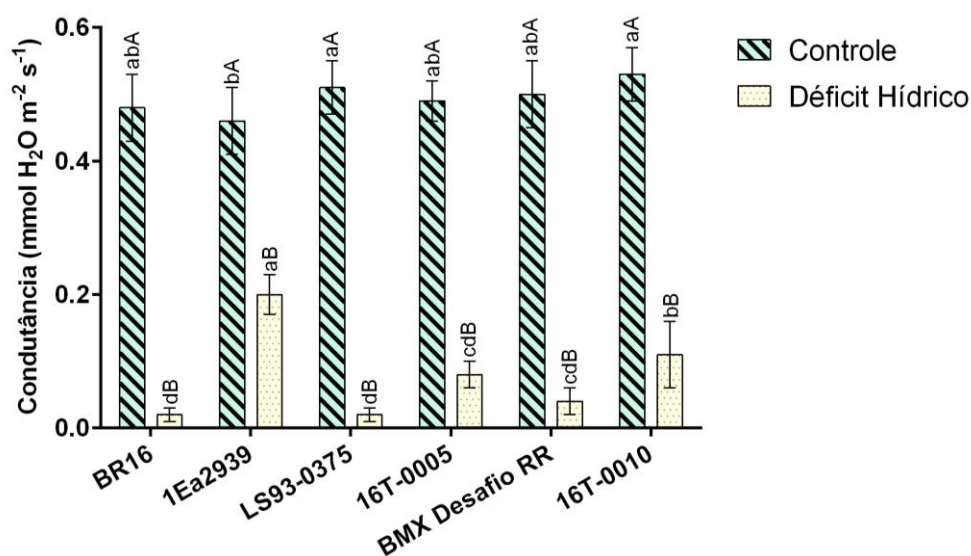


Figura 1. Dados de condutância estomática ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os genótipos 1Ea2939; e 16T-0005; 16T-0010; BMX-DESAFIO RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os dados de taxa fotossintética (Figura 2), indicaram que os genótipos LS93-0375; GM 1Ea2939 e 16T-0010 apresentaram maiores valores na condição C. Porém, no DH o genótipo LS93-0375 apresentou grande redução, quando comparado à condição C; enquanto a linhagem GM 1Ea2939 manteve uma taxa mais alta e não diferiu entre as hídricas. Na condição de DH, o genótipo 16T-0010 apresentou uma pequena redução em comparação à condição C, mas não diferiu estatisticamente da condição de DH da linhagem GM 1Ea2939. O genótipo 16T-0005 diferiu da linhagem GM 1Ea2939 e do parental convencional 16T-0010 na condição DH, com uma taxa um pouco menor, porém ainda com valores acima de todos os parentais analisados neste experimento.

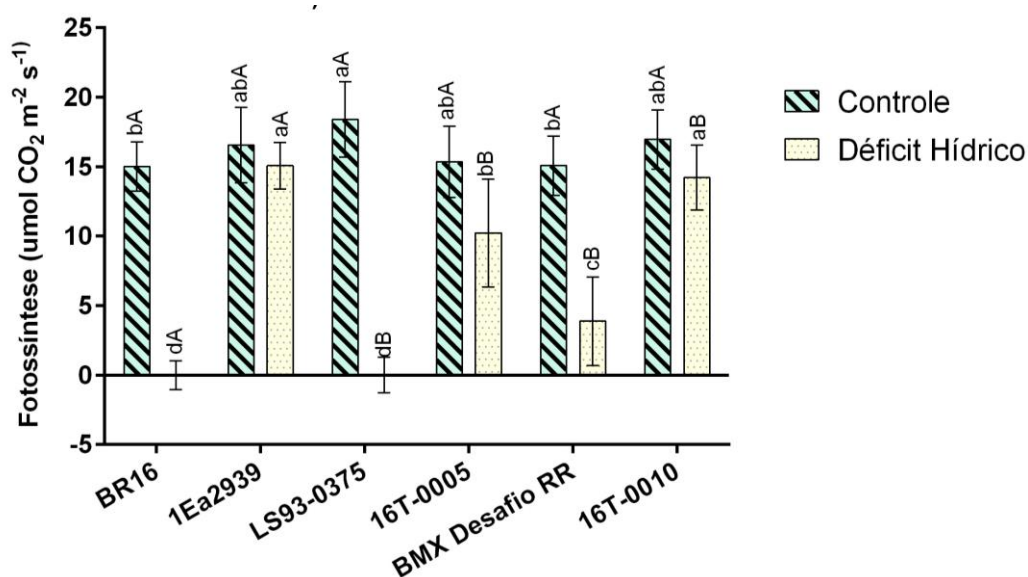


Figura 2. Comparação da Fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para os dados de concentração interna de CO_2 (Figura 3), os resultados mostraram que na condição C, os genótipos não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,01$). Já na condição DH os genótipos convencionais LS93-0375 e BR16 diferiram dos demais genótipos, não havendo diferença significativa entre si ($p \leq 0,01$). Os valores de concentração interna de CO_2 variaram entre 395,06 e 385,80 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, respectivamente. A linhagem GM 1Ea2939 apresentou concentração de CO_2 de 281,65 e os genótipos 16T-0010; BMX-Desafio RR e 16T-0005, valores respectivos de 223,95; 222,17 e 204,96 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, não havendo diferença significativa entre si ($p \leq 0,01$).

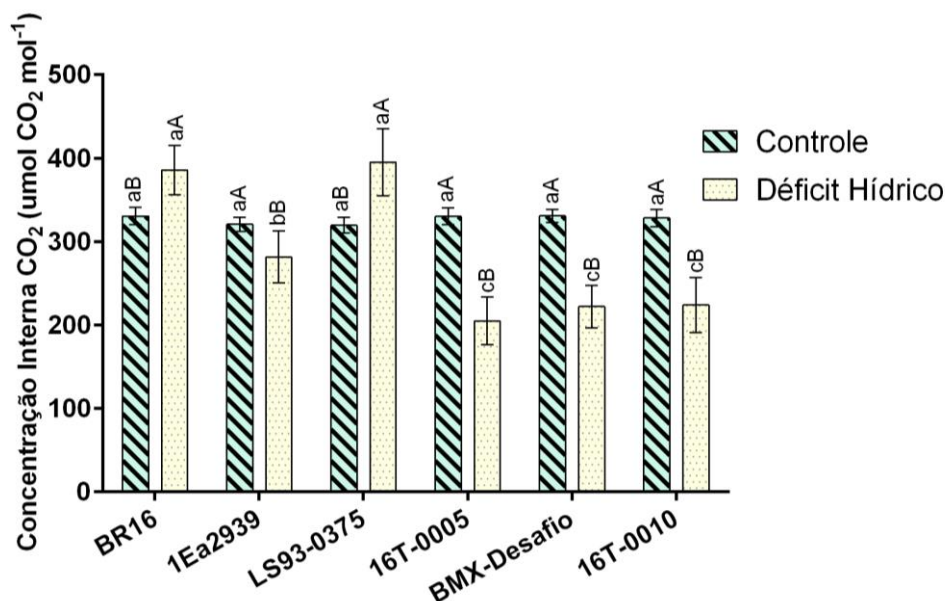


Figura 3 Comparação da Concentração Interna de CO₂ (µmol CO₂ mol⁻¹) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para as análises de teor relativo de água (TRA) (Figura 4) não foi identificada diferença entre os genótipos na condição C. Já na condição DH, o genótipo GM 1Ea2939 e as linhagens 16T-0005 e 16T-0010, apresentaram os maiores valores para o TRA e estes não diferiram entre a condição C e DH pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Já os parentais BMX-Desafio RR, LS93-0375 e o *background* convencional BR16 apresentaram uma redução de 34,32; 43,53 e 47,53%, respectivamente, no TRA entre as condições DH e C.

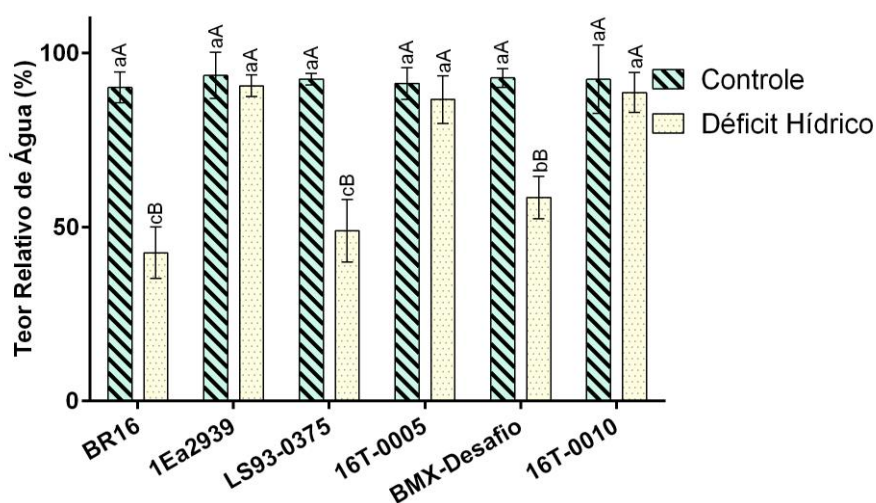


Figura 4. Dados de Teor Relativo de Água (%) entre os genótipos GM 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit

Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para a variável transpiração (Figura 5), os dados obtidos mostraram que os genótipos não diferiram entre si na condição C ($p \leq 0,05$). No entanto, na condição de DH o genótipo GM 1Ea2939 apresentou a maior taxa transpirativa em comparação aos demais, seguida pelos genótipos 16T-0010 e 16T-0005, que não apresentaram diferença entre si ($p \leq 0,05$). Os parentais BMX-Desafio RR, LS93-0375 e a *background* convencional BR16 apresentaram os índices mais baixos da taxa transpirativa não havendo, portanto, diferença significativa entre si ($p \leq 0,01$).

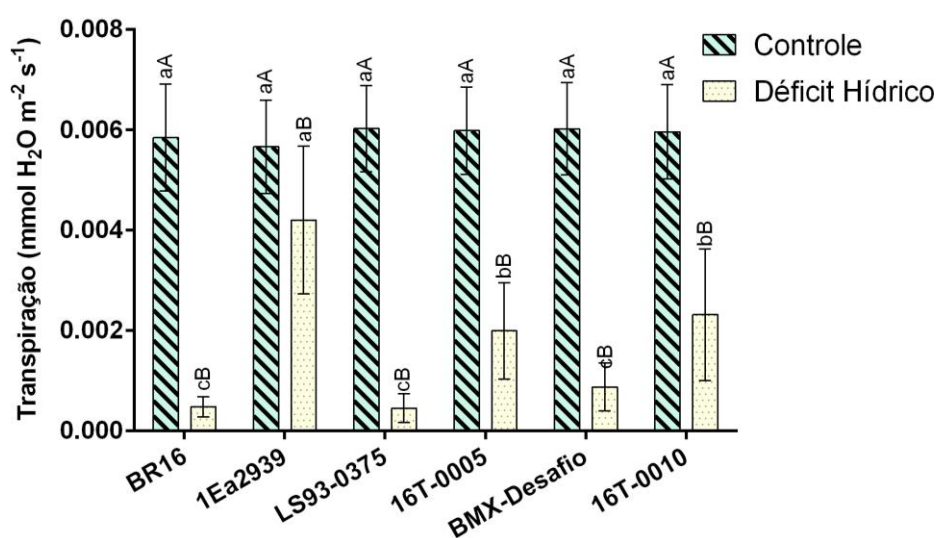


Figura 5. Dados de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para os genótipos GM 1Ea2939; e convencionais 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para a temperatura foliar (Figura 6) e na condição DH, os genótipos LS93-0375 e a *background* convencional BR16 não diferiram dos genótipos 16T-0005 e BMX-Desafio RR, que apresentaram as maiores médias de temperatura. O genótipo 16T-0010 não diferiu destes dois últimos, mas diferiu dos genótipos LS93-0375 e do *background* convencional BR16, com uma média de temperatura um pouco menor. O genótipo GM 1Ea2939 apresentou a menor média de temperatura foliar em comparação aos demais genótipos analisados. Na condição C, não foi identificada diferença ($p \leq 0,05$) entre os materiais analisados.

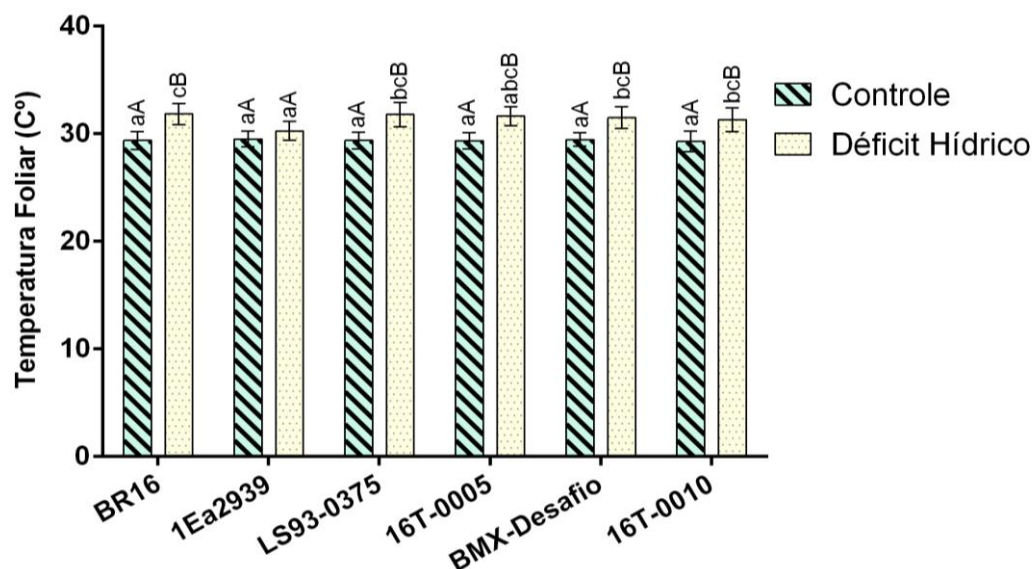


Figura 6. Comparação da Temperatura Foliar (C°) (TLEAF) entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle e Déficit Hídrico). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os dados de UGS (Umidade Gravimétrica do Solo) não apresentaram interação entre as condições hídricas e os genótipos, porém houve diferença significativa entre os genótipos (Figura 7) e entre as condições C e DH (Tabela 3). Entre os genótipos, 16T-0010, 16T-0005 e 1Ea2939, houve apresentação dos maiores teores de água no solo não demonstrando, entretanto, diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). Já as médias dos genótipos BMX-Desafio RR, LS93-0375 e BR16 apresentaram os menores valores e não diferiram significativamente entre si. Na condição de DH, os genótipos apresentaram média de 23,22% e na condição C de 5,31%.

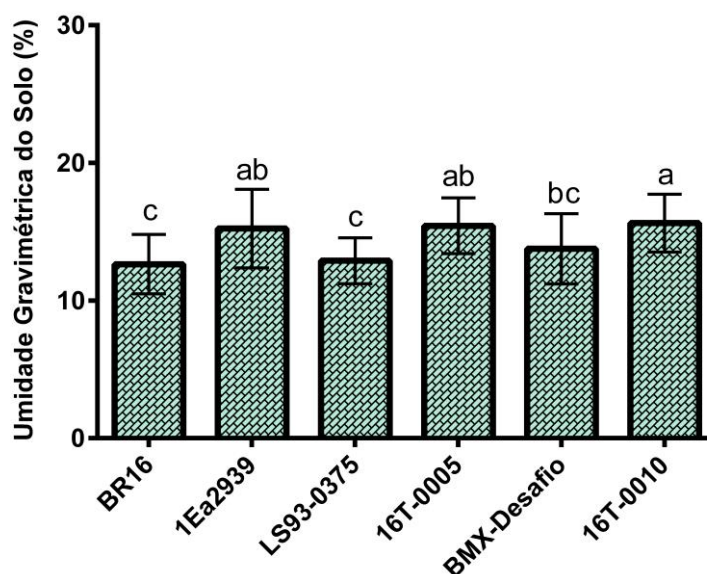


Figura 7. Dados de Umidade Gravimétrica do Solo (%) obtidos para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabela 3. Dados de Umidade Gravimétrica do Solo (%) nas condições hídricas Controle - C e Déficit Hídrico – DH.

Condição	UGS (%)
	Média
Controle	23,22 ^a
DH	5,31 ^b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa entre si ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A UGS possui forte correlação com os demais resultados fisiológicos chegando a 0.95 quando se trata da condutância estomática e 0.86 com a transpiração (Figura 8). Normalmente, as medidas fisiológicas possuem alta correlação entre si. Dentre as observadas, a concentração interna de CO_2 é a menos relacionada às demais, chegando a uma correlação máxima de -0.3. A temperatura foliar é a única, dentre as aqui avaliadas, que apresenta correlação negativa com as demais.

A	0.77***	-0.21*	-0.69***	0.83***	0.90***	0.68***
Gs		0.24**	-0.76***	0.94***	0.71***	0.95***
Ci			-0.20*	0.14 ^{ns}	-0.30**	0.28**
Tleaf				-0.67***	-0.55***	-0.71***
Trans					0.79***	0.86***
TRA						0.64***
UGS						

Figura 8. Correlação entre as medidas fisiológicas, fotossíntese (A), condutância estomática (Gs), conteúdo interno de CO₂, temperatura foliar (Tleaf), transpiração (Trans) e teor relativo de água (TRA), e a umidade gravimétrica do solo (UGS). ns: não significativo ($p > 0.05$); * significativo a 5%; ** significativo a 1%; *** significativo a 0.1% pelo teste de Pearson.

Ainda, dentre as variáveis analisadas, pode-se citar a forte correlação entre a condutância estomática e a transpiração (0.94), teor relativo de água e fotossíntese (0.9) e entre a transpiração e a fotossíntese (0.83).

5.3 Parâmetros de crescimento e agrônômicos

Para a característica altura de plantas, os dados mostraram interação entre os fatores de déficit hídrico e genótipo (Figura 9). Na condição controle, a linhagem 16T-0010 apresentou a maior altura de plantas com 130,56 cm; seguido pelo genótipo GM 1Ea2939 e da linhagem 16T-0005, que apresentaram altura de 102,78 e 94,56 cm, respectivamente. O genótipo BMX Desafio RR não apresentou diferença significativa da linhagem 16T-0005 e os genótipos BR16 e LS93-0375 apresentaram os menores valores para a altura, 37,22 e 32,33 cm, respectivamente, não havendo, portanto, diferença significativa entre si.

Na condição de DH, no entanto, foi a linhagem 16T-0005 que apresentou a maior altura de planta, com 84,33 cm; seguida do genótipo GM 1Ea2939 e da linhagem 16T-0010, que apresentaram altura de 95,44 e 84,33 cm. O genótipo BMX Desafio RR não diferiu estatisticamente da linhagem 16T-0010 e os genótipos BR16 e LS93-0375 apresentaram os menores valores de altura na condição de déficit hídrico, respectivamente, 37,13 e 28,44 cm, não havendo diferença significativa entre si.

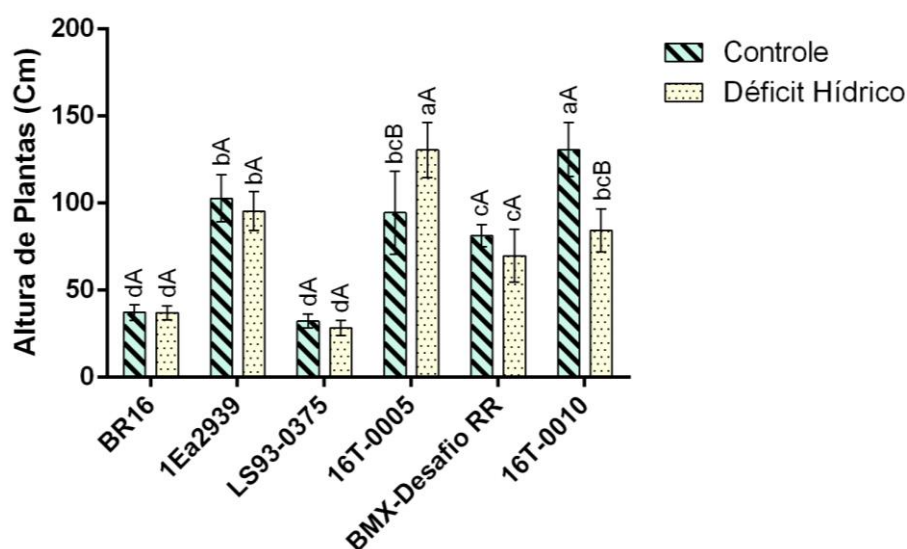


Figura 9. Dados de altura de plantas (cm) para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle - C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para o parâmetro número de nós, a análise de variância indicou que houve efeito apenas entre os genótipos, sendo que as linhagens 16T-0005 e 16T-0010 apresentaram o maior número de nós, sendo uma média de 21,22 e 18,94, respectivamente (Figura 10). Os genótipos BMX Desafio RR e 1Ea2939 não diferiram significativamente da linhagem 16T-0010 e os genótipos BR16 e LS93-0375 apresentaram os menores valores para o número de nós por planta, com uma média de 10,12 e 8,28 respectivamente, não havendo diferença significativa entre si.

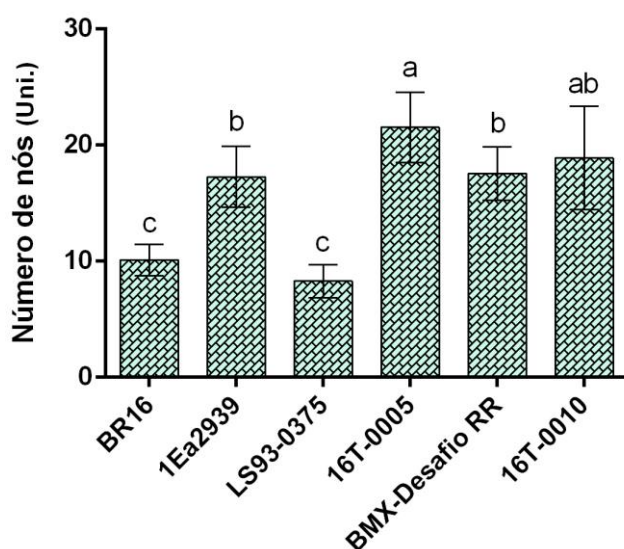


Figura 10. Número de nós amostrados para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

O genótipo GM 1Ea2939 apresentou o maior número de vagens com sementes, seguido da linha 16T-0010 e pelo genótipo BR16, não havendo, portanto, diferença significativa entre si (Figura 11). A linhagem 16T-0005 e o genótipo BMX Desafio RR, não diferiram significativamente do genótipo BR16. O genótipo LS93-0375 apresentou o menor número de vagens com sementes, com uma média de 21,83 vagens por planta.

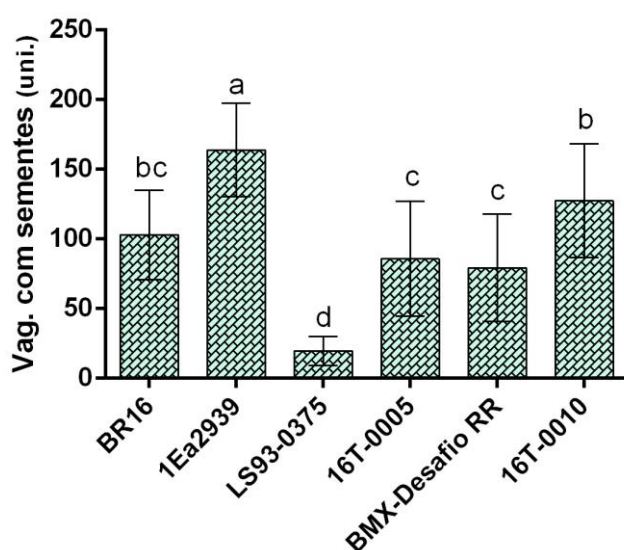


Figura 11. Comparação do número de vagens com sementes entre os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Na avaliação do número de vagens sem sementes, houve interação entre os fatores genótipo e condição hídrica. Na condição controle, o genótipo convencional BR16 e o genótipo GM 1EA2939, apresentaram o maior número de vagens sem sementes, respectivamente, 15 e 12,56 vagens; seguidos pela linhagem 16T-0010 que não apresentou diferença estatística, quando comparada ao genótipo GM 1Ea2939 (Figura 12). Os demais genótipos, BMX Desafio RR, 16T-0005 e LS93-0375, apresentaram o menor número de vagens sem sementes, não havendo, portanto, diferença significativa entre si. Na condição de déficit hídrico, os genótipos GM 1Ea2939 e convencional BR16 apresentaram os maiores números de vagens sem sementes, respectivamente 12,11 e 9 vagens. As linhagens 16T-0005 e LS93-0375 não diferiram significativamente do genótipo *background* BR16. A linhagem 16T-0010 e o genótipo BMX Desafio RR não apresentaram diferença significativa quando comparadas à linhagem 16T-0005 e ao genótipo LS93-0375.

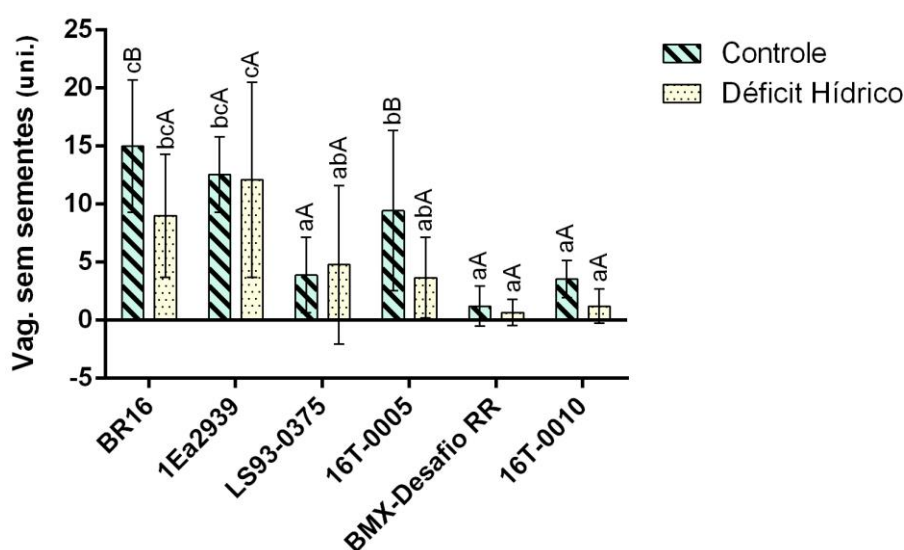


Figura 12. Número de vagens sem sementes para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 sob duas condições hídricas (Controle – C e Déficit Hídrico - DH). Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre genótipos em cada condição hídrica e mesma letra maiúscula não diferem entre as condições pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para o parâmetro número total de sementes viáveis, foi observado apenas o efeito simples de genótipo (Figura 13). O genótipo GM 1Ea2939 e a linhagem 16T-0010 apresentaram o maior número de sementes por planta, respectivamente, 331,89 e 276,89 sementes viáveis; sendo seguidos pela linhagem 16T-005 e pelo genótipo BR16 que não diferiram significativamente da linhagem 16T-0010. O

genótipo LS93-0375 apresentou o menor número de sementes viáveis por planta com uma média de 40,56 sementes.

Os dados de massa seca de grãos mostraram que o genótipo GM 1Ea2939 e a linhagem 16T-0010 apresentaram os maiores valores de massa seca de grãos, respectivamente, 55,65 e 48,07 g, não havendo diferença significativa entre si (Figura 14). O genótipo LS93-0375 apresentou a menor massa seca de grãos com uma média de 4,76 g.

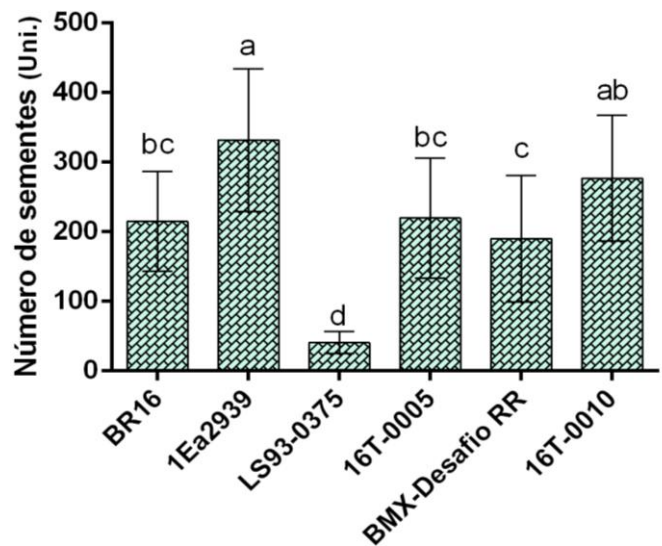


Figura 13. Número total de sementes viáveis para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

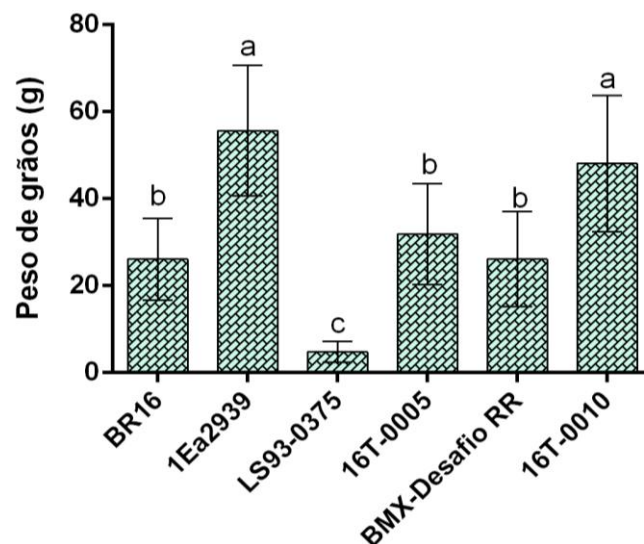


Figura 14. Peso total de grãos (g) para os genótipos 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

5.4 Quantificação da expressão relativa de genes via RT-qPCR

Quando a linhagem GM 1Ea2939, que contém a construção gênica 35S:AtAREB1A foi utilizada como calibrador, os dados de expressão do transgene AtAREB1 nos genótipos 16T-0005 e 16T-0010 foram levemente superiores na condição Controle (Figura 15). Já a diferença na expressão encontrada entre as condições Controle e Déficit Hídrico não foi superior a 1x, devido a presença do promotor 35S na construção do transgene.

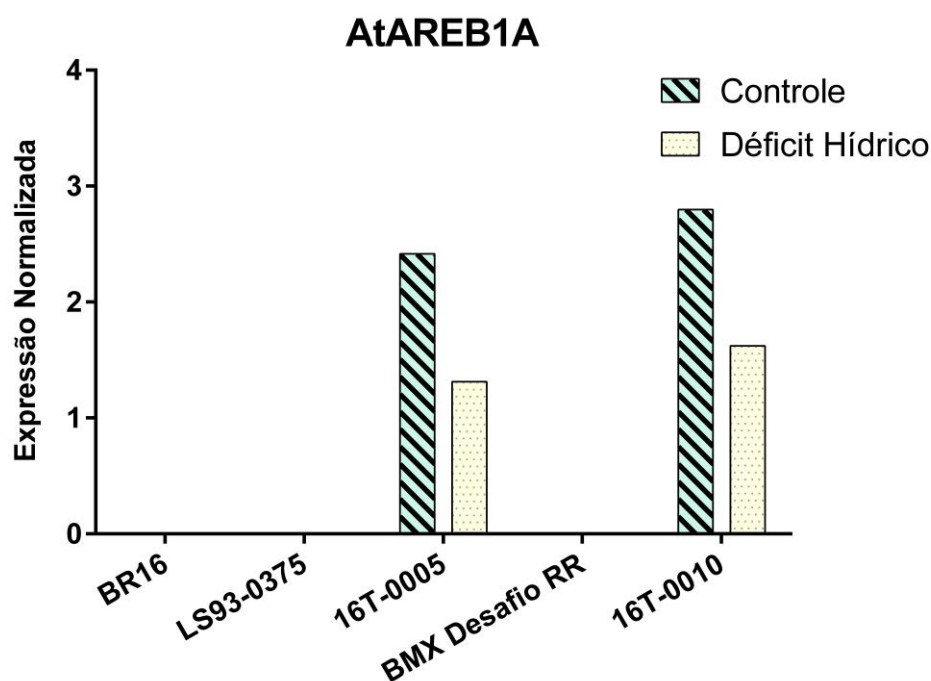


Figura 1515. Expressão gênica normalizada do gene AtAREB1A, nas condições DH e C para os genótipos 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16 em comparação ao genótipo calibrador GM 1Ea2939. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX.

A expressão do transgene *AtAREB1A* foi observada no genótipo GM 1Ea2939, e nos convencionais 16T-0005 e 16T-0010 e não foi identificada nos genótipos parentais LS93-0375, BMX Desafio RR e BR16 pois este genótipos não possuem a construção genica do transgene *AtAREB1A* (Figura 16). O maior nível de expressão na condição de C foi identificado na linhagem GM 16T-0010, sendo que não houveram grandes diferenças entre as demais linhagens em ambas as condições.

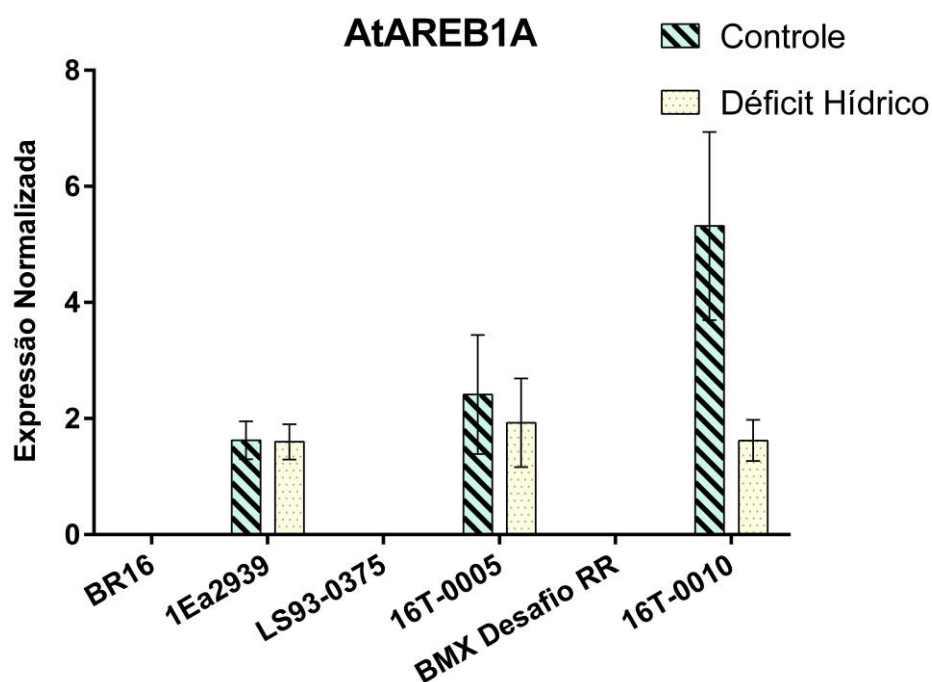


Figura 16. Expressão gênica normalizada do transgene AtAREB1A, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas, normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

Para a expressão do gene *GmRAB18* (Glyma09g31740), que codifica uma desidrina, os genótipos convencionais LS93-0375, BMX Desafio RR e BR16 apresentaram o maior nível de expressão deste gene em condições de DH, sendo 700 vezes mais expresso no genótipo LS93-0375, seguido pelo genótipos BMX Desafio RR (250x) e pela BR16 (40x). Os genótipos GM apresentaram a menor expressão do gene *GmRAB18* (10x). Na condição controle não houve diferença de expressão deste gene em todos os genótipos (Figura 17).

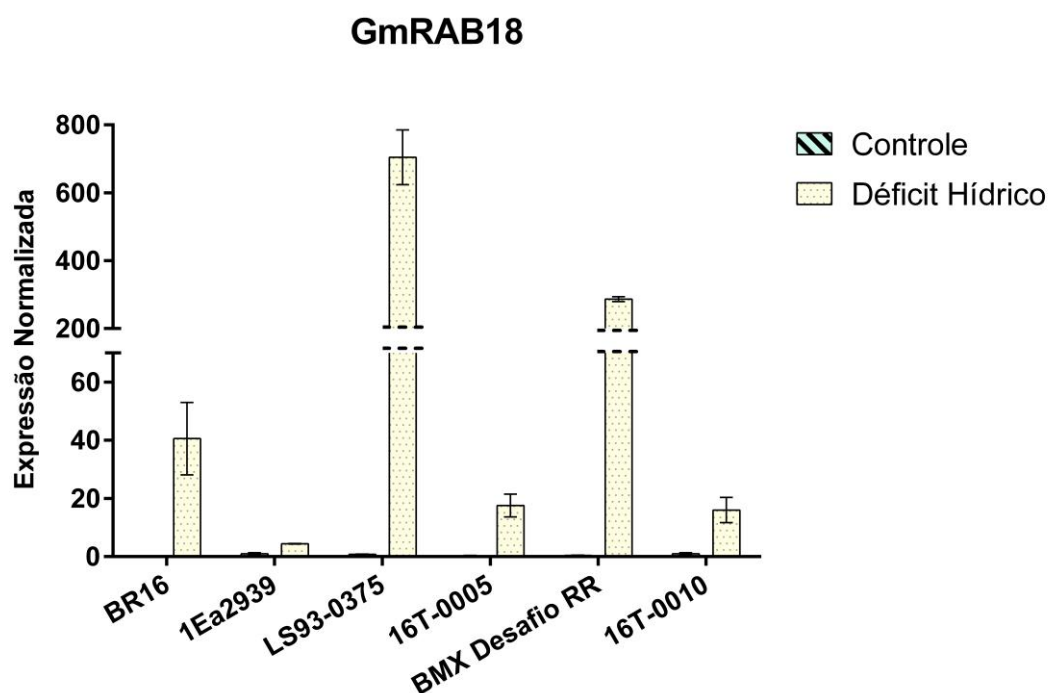


Figura 17. Expressão gênica normalizada do gene GmRAB18, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

Os dados de expressão para o gene *GmSnRK2* (Glyma02g15330) que codifica uma quinase, mostraram que os não houveram grandes mudanças na expressão deste gene nos genótipos GM 1Ea2939; 16T-0005; 16T-0010 e LS93-0375. O genótipo BR16 apresentou os menores valores de expressão deste gene e o genótipo BMX Desafio RR apresentou uma menor expressão deste gene na condição Controle quando comparados aos demais genótipos (Figura 18).

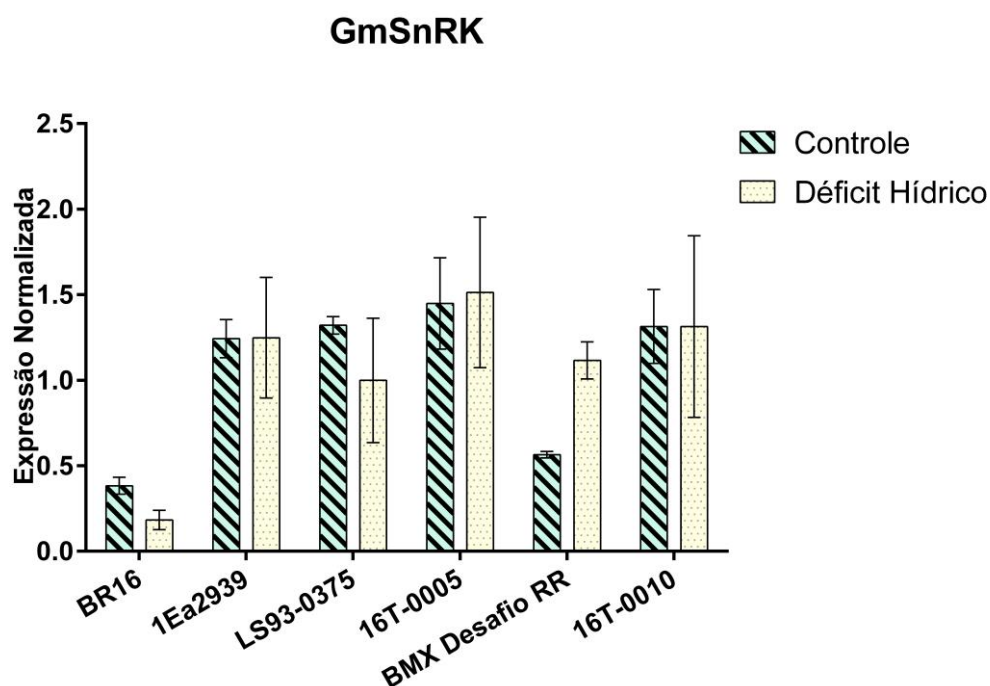


Figura 18. Expressão gênica normalizada do gene GmSnRK, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

Para o gene GmPP2C (Glyma14g37480), que codifica uma fosfatase, os dados de expressão gênica indicaram que os genótipos parentais BMX Desafio, BR16 e LS93-0375 apresentaram maiores níveis de expressão na condição DH, sendo até 2x superior que suas respectivas linhagens GM. Já o genótipo GM 1Ea2939 e as linhagens, 16T-0010 e 16T-0005 apresentaram um nível de expressão mais baixo (Figura 19).

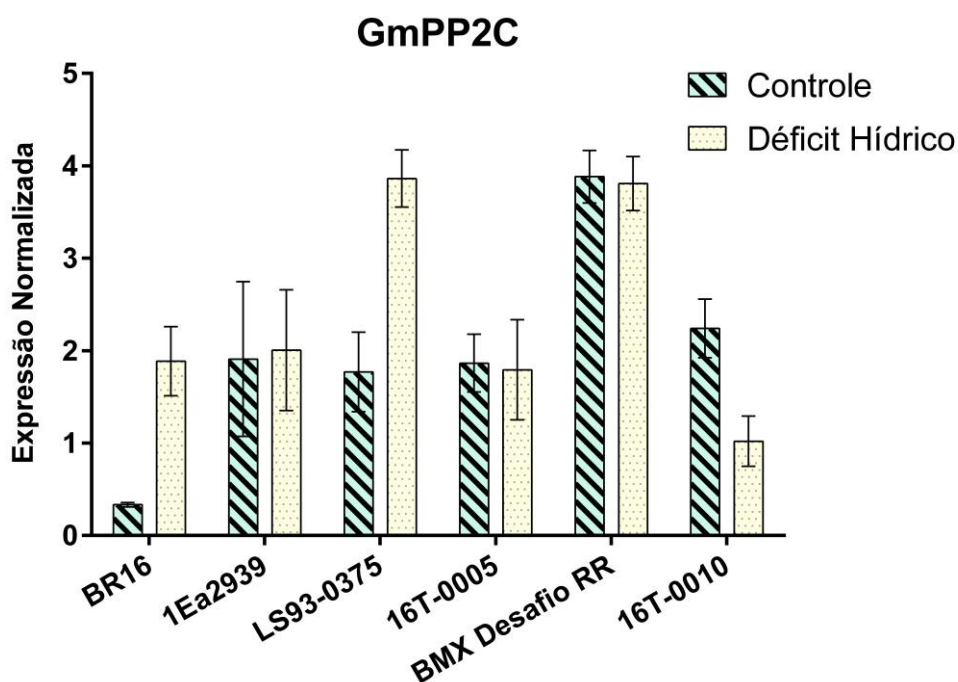


Figura 19. Expressão gênica normalizada do gene GmPP2C, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

Para o gene *HSP* (*Heat Shock Protein*) (Glyma17G072400), que codifica uma proteína de choque térmico, envolvida na proteção de cadeias nascentes de proteínas em condições de seca, os dados de expressão mostraram que os genótipos que apresentaram maior nível de expressão na condição DH, foram as cultivares convencionais BMX Desafio e LS93-0375. Já os genótipos 16T-0005, 16T-0010 e 1Ea2939 apresentaram um nível de expressão menor (Figura 20).

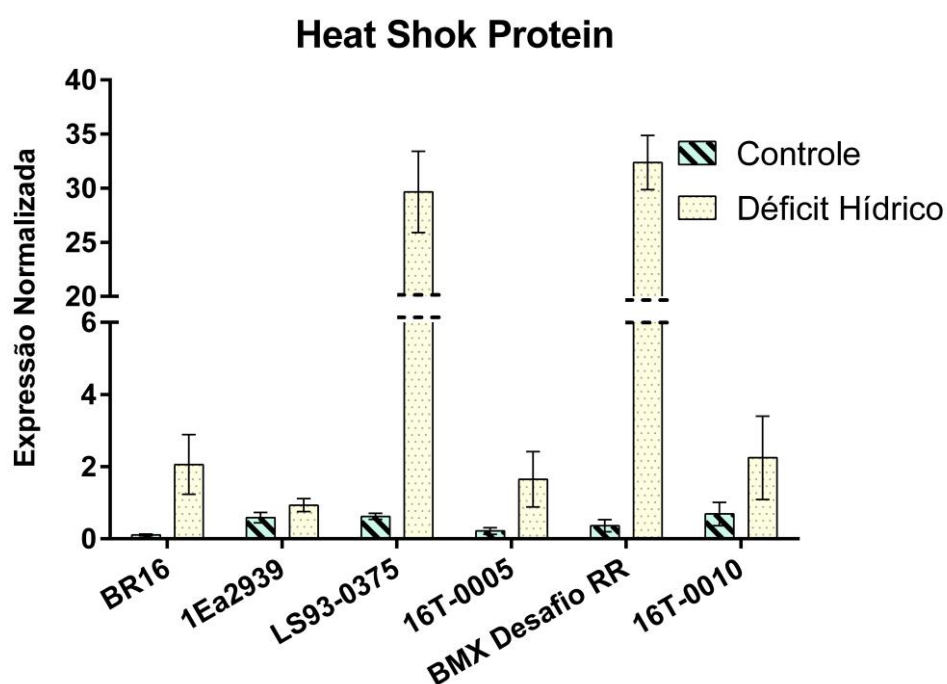


Figura 20. Expressão gênica normalizada do gene *HSP*, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

Os parentais LS93-0375, BR16 e BMX Desafio RR, apresentaram os maiores níveis de expressão do gene da Dehidrina (*Glyma09G185500*) principalmente o genótipo LS93-0375. Já para a linhagem GM 1Ea2939 e para os genótipos convencionais 16T-0005, 16T-0010, os níveis de expressão quantificados foram menores na condição DH quando comparados aos seus respectivos parentais (Figura 21). Este gene seca responsivo participa entre outras funções do ajuste osmótico em condições de déficit hídrico.

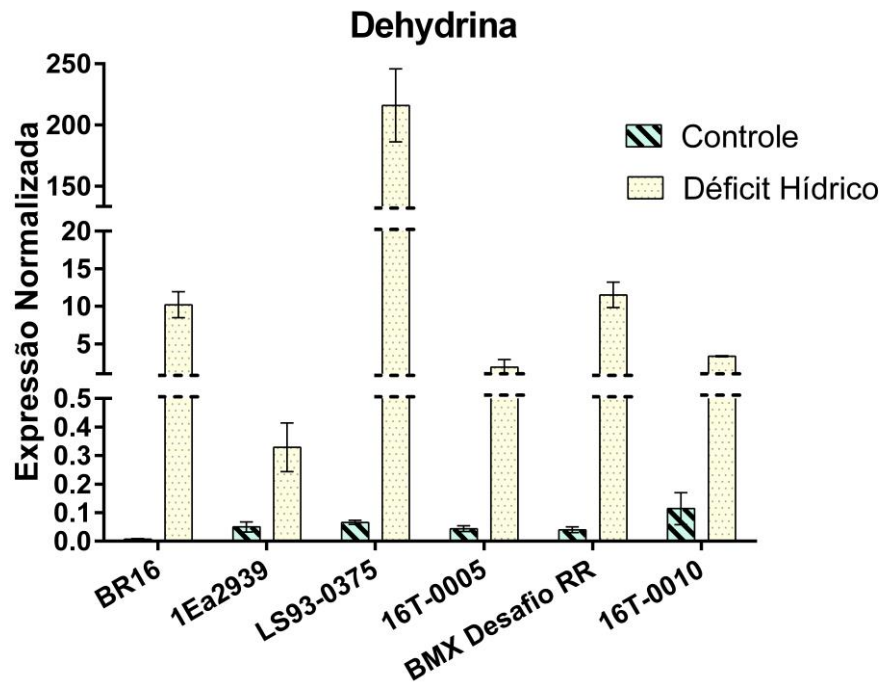


Figura 21. Expressão gênica normalizada do gene Dehydrina, na condição de DH para os genótipos 1Ea2939, 16T-0005; 16T-0010; BMX-Desafio RR; LS93-0375 e BR16. Os dados foram obtidos a partir de 9 plantas e normalizados com os genes de referência, FYVE e NUDIX, e calibrados com a condição controle respectiva de cada genótipo.

6 DISCUSSÃO

A característica de tolerância à seca é controlada por diversos fatores, sendo induzida por respostas fisiológicas e bioquímicas em nível celular e molecular. Genes que controlam diferentes funções são induzidos ou reprimidos na resposta ao estresse (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007), tornando difícil a caracterização morfológica destas plantas em programas de melhoramento. A utilização de genes marcadores que permitam a identificação visual de plantas que receberam o gene de tolerância à seca, pode facilitar a identificação de plantas tolerantes durante as etapas de melhoramento genético.

Após a realização de um cruzamento, a geração F₁ apresenta 100% de indivíduos heterozigotos (Aa) devendo conter apenas uma cópia do transgene (A) e de acordo com as leis de segregação propostas por Mendel, após um novo processo de autofecundação, a próxima geração (F₂) deverá apresentar uma frequência de alelos "A" de 3:1. A ocorrência de segregação 3:1, é um fator fundamental que indica estabilidade na expressão e na hereditariedade do transgene ao longo do avanço de gerações, é um fator determinante para o sucesso no desenvolvimento de novas cultivares transgênicas (ZHAO et al., 2007).

A utilização do gene marcador de seleção *bar* juntamente ao transgene de interesse, permite que a determinação dos indivíduos positivos para a presença do transgene seja realizada de maneira mais rápida e com um menor custo. O teste de qui-quadrado (χ^2) realizado nas sete populações, indicou significância ($P > 0,05$) para as sete populações (Tabela 2). Este resultado preliminar indica que, juntamente com a sequência de interesse, a utilização deste gene marcador que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, foi eficiente na seleção das plantas positivas e negativas, indicando estabilidade na expressão e transferência da característica para novos indivíduos.

A seca é o principal fator abiótico responsável por restrições no desenvolvimento das culturas e na produtividade agrícola (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003). De modo geral, as plantas como organismos sésseis, desenvolveram ao longo da evolução, respostas fisiológicas ou adaptações às condições de falta de água. Essas respostas vegetais dependem do tempo de duração da desidratação e da intensidade. O efeito da deficiência hídrica na produção depende ainda da época de ocorrência, de sua severidade, do genótipo da

planta e do estágio de desenvolvimento vegetal (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; BERLATO; MOLION, 1981; FAGERIA, 1989).

Segundo Sirichandra et al. (2009), uma das respostas fisiológicas iniciais contra o DH é a diminuição da condutância estomática, pois esta reduz a evaporação através das folhas, diminui a perda de água e limita a difusão de CO₂ para os cloroplastos. No experimento de indução de déficit hídrico, realizado neste trabalho, pode-se observar pelas leituras de condutância estomática que as plantas de soja GM apresentaram condição moderada de tolerância à seca, enquanto os parentais apresentaram sinais de estresse severo por déficit hídrico. O genótipo parental GM 1Ea2939 apresentou menores valores de condutância na condição controle, sugerindo mecanismos que impliquem em menor perda de água para o ambiente, permitindo que uma maior quantidade de água fique disponível ao longo do tempo no substrato, para posterior uso. Segundo Li et al. (2017) a condutância está associada a eficiência no uso da água pela planta, regulando a perda de água e as trocas gasosas realizadas com o ambiente pela folha. Para Chaves; Flexas; Pinheiro, (2009) o declínio da condutância estomática, mesmo que de forma leve, pode incrementar a tolerância ao déficit hídrico pela melhor eficiência de uso da água disponível no solo. Assim, o genótipo GM 1Ea2939 como já relatado por Marinho et al. (2016) e Pagliarini-Fuganti et al. (2017) possui mecanismos de tolerância à seca. Do mesmo modo, resposta semelhante foi identificada nos genótipos 16T-0005 e 16T-0010 (provenientes do cruzamento entre a linhagem GM 1Ea2939 e os genótipos LS93-03-75 e BMX Desafio RR, respectivamente), que apresentaram resultados superiores de g_s na condição de DH, quando em comparação com seus respectivos parentais, indicando que o cruzamento promoveu maior tolerância ao déficit hídrico nestas linhagens.

A resposta de maior tolerância à seca nos genótipos 16T-0005 e 16T-0010 pode estar relacionada à expressão do fator de transcrição ABA- dependente AREB1 (Figura 15). Diversos estudos indicam que o ABA é um hormônio de resposta a estresses ambientais como a seca, e é capaz de regular a abertura estomática (LI et al., 2017; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004a; ZHANG; SCHURR; DAVIES, 1987). Segundo Miyashita et al., (2005) a regulação da condutância estomática é dada principalmente pelo potencial hídrico nas raízes, através do incremento da concentração de ABA no xilema.

Em razão do fechamento estomático, a fotossíntese é um dos primeiros fatores afetados pelo déficit hídrico, sendo principalmente regulada pela condutância estomática (CHAVES, 1991). Neste trabalho, os genótipos que apresentaram maior condutância estomática, conseqüentemente, apresentaram também maior taxa fotossintética. Cabe ressaltar que a resposta de fechamento estomático, que conduz à diminuição da condutância, está relacionada à expressão de genes como fosfatases e quinases. Nos genótipos 1Ea2939 e 16T-0005 e 16T-0010, o nível de expressão destes genes foi menor, implicando no fechamento estomático mais tardio, quando comparado aos outros genótipos.

Os dados de taxa fotossintética obtidos neste experimento para o genótipo GM 1Ea2939 corroboram com os obtidos por Marinho et al.(2016), que também relatou resultados superiores do genótipo 1Ea2939, em comparação com o genótipo convencional BR16, sob a condição DH. Segundo Anjum et al. (2011), a capacidade de adaptação das culturas em diferentes ambientes está relacionada com a sua capacidade de adaptação fotossintética, que é regulada por mecanismos bioquímicos e fisiológicos e, conseqüentemente, afeta a capacidade de crescimento e produtiva de todas as plantas.

Com a redução da g_s as trocas gasosas são limitadas e, conseqüentemente, a concentração interna de CO_2 tende a apresentar uma redução, seguindo a diminuição da g_s . A abertura estomática permite a saída de água para o ambiente e também permite a absorção de CO_2 . Portanto, o fechamento estomático, que é considerado uma das primeiras respostas ao déficit hídrico, é o responsável pela redução da C_i nas folhas (DEL BLANCO et al., 2000; FLEXAS; MEDRANO, 2002; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004b).

Apesar da literatura descrever que uma redução da g_s , pode resultar também em queda na C_i , os dados, obtidos neste trabalho, para os genótipos convencionais parentais LS93-0375 e BR16, podem ser explicados por fatores não-estomáticos. Oliveira et al., (2002) avaliou parâmetros fisiológicos de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e também encontrou em seu trabalho variações de C_i , em plantas sob déficit hídrico. Segundo os autores, quando a condutância estomática atingiu valores menores que $50 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ocorreu um aumento exponencial na concentração interna de CO_2 .

Outra importante estratégia para minimizar os efeitos do déficit hídrico na planta é a conservação e uso eficiente da água celular disponível. Neste contexto,

os genótipos convencionais parentais BMX-Desafio RR, LS93-0375 e BR16 apresentaram grande redução no seu TRA, sob DH, sugerindo que estes genótipos apresentam menor capacidade de regulação na perda de água. Para o parental GM 1Ea2939 e os genótipos provenientes de cruzamentos (16T-0010 e 16T-0005) valores superiores de TRA foram identificados, sugerindo que estes genótipos possuem maior capacidade de regulação no uso da água, e, conseqüentemente apresentam um status hídrico melhor, característica esta que pode estar relacionada à expressão do fator de transcrição AREB e genes seca- responsivos. O TRA é considerado uma das principais formas de medição do status hídrico da planta, sendo utilizado como indicador da atividade metabólica nos tecidos e também como uma das principais ferramentas para se inferir tolerância ao déficit hídrico (ANJUM; XIE; WANG, 2011). Segundo Pirzad et al. (2011) os valores de TRA são superiores em plantas que apresentam maior tolerância ao déficit hídrico.

O maior TRA apresentado pelos genótipos GM pode estar relacionado a maior conservação da água e, conseqüentemente, a maior disponibilidade hídrica no substrato. E com uma maior quantidade de água disponível, as plantas conseguem manter uma taxa transpirativa superior, como ocorrido nos genótipos que contém a construção *35S:AtAREB1* (genótipo GM 1Ea2939 e genótipos 16T-0005 e 16T-0010). Diversos trabalhos relataram que a maior conservação de água no solo pode decorrer do declínio precoce da taxa transpirativa, permitindo que ocorra maior conservação da água neste substrato a partir da menor perda de água para o ambiente ao longo dos dias (RAY; SINCLAIR, 1998; VADEZ; SINCLAIR, 2001).

Segundo Tuberosa (2012), a preservação de água no solo é mais vantajosa quando a planta é submetida a um período mais prolongado de déficit hídrico, não sendo uma alternativa vegetal muito comum em períodos de seca mais curtos, pois esta redução na taxa transpirativa pode afetar outros parâmetros e, conseqüentemente, reduzir crescimento e produtividade.

As diferenças de temperatura foliar identificadas neste trabalho, na condição C e DH, corroboraram com a afirmação de Ehrler et al., (1978). Segundo estes autores, a temperatura da folha pode ser um indicador de estresse, pois a diminuição da g_s , acarreta em aumento da temperatura foliar, em condições em que outros fatores importantes como a velocidade do vento e a pressão de vapor sejam constantes. Este aumento da temperatura foliar pode estar ligado ao aumento da respiração, juntamente com a redução da transpiração, devido ao fechamento

estomático. Esta variação da taxa transpirativa pode afetar a temperatura da folha em pequena escala dependendo das condições do ambiente. Segundo Gates (1968), a taxa transpirativa irá implicar grandemente na temperatura foliar. O autor demonstrou, em seus experimentos, que a temperatura de uma folha com a transpiração ativa chegou a ficar 10C° mais baixa quando comparada a uma folha que não transpirava, ambas em condições de temperatura do ar a 40C°.

Outro parâmetro, embora não tenha apresentado interação entre genótipo e tratamento, mas que indica superioridade na eficiência do uso da água, é a umidade gravimétrica do solo. Para o genótipo GM 1Ea2939 e seus respectivos cruzamentos, os genótipos 16T-0005 e 16T-0010, apresentaram maiores valores de UGS, indicando que estes genótipos conseguem manter uma maior quantidade de água disponível no solo.

As respostas moleculares para o déficit hídrico envolvem diversos mecanismos fisiológicos e moleculares. Um dos mecanismos que permite a maior tolerância ao estresse é o aumento da eficiência no uso da água disponível no solo, permitindo que esta permaneça disponível por um período mais prolongado à planta. O aumento na síntese do ABA, provocado pelo déficit hídrico, induz o fechamento estomático e a redução da taxa fotossintética e transpirativa além de regular a atividade de diversos genes de resposta ao estresse (UMEZAWA et al., 2010).

A determinação da expressão por RT-qPCR do gene GmRAB18 foi mais expresso nos genótipos BR16, LS93-0375 e BMX Desafio RR. Resultado semelhante foi igualmente obtido por Marinho et al. (2016) em que genótipos que não continham o gene AREB, também apresentaram aumento na expressão deste gene. De acordo com os autores, a alta expressão deste gene está associada ao maior nível de déficit hídrico ao qual estas plantas estão submetidas. Os dados de condutância estomática corroboram com este resultado, pois indicaram que estes genótipos se encontravam em condição de estresse severo a moderado.

Para o gene que codifica a fosfatase GmPP2C, os genótipos que apresentaram maiores níveis de expressão foram LS93-0375 e BMX Desafio RR na condição DH. Estes resultados corroboram com os obtidos por Marcolino-Gomes et al. (2014), em que as linhagens convencionais também apresentaram um alto nível de expressão deste gene. A fosfatase PP2C atua como regulador na via de sinalização do ABA, impedindo a autofosforilação das quinases SnRK2, as quais são necessárias para que se ative a expressão de genes alvos. Na presença do ABA a

atividade da fosfatase PP2C é reprimida, permitindo a autofosforilação da quinase e posterior ativação de genes alvos (SHEARD; ZHENG, 2009). A expressão obtida para o gene GmSnRK2 corrobora com os dados obtidos para a proteína PP2C, onde a *downregulação* desta proteína permite a ativação da SnRK2, sendo que os genótipos GM apresentaram maiores níveis de expressão desta proteína. O genótipo BMX Desafio RR também apresentou uma maior expressão desse gene quando comparado aos demais genótipos. Este genótipo também apresentou uma maior taxa de condutância estomática que os demais parentais nas análises fisiológicas, indicando que esta resposta pode estar relacionada com o maior nível de expressão do gene GmSnRK2.

A *Deydrina* e a *Heat Shock Protein* tiveram sua expressão aumentada nos genótipos não GM. Este resultado corrobora com o observado por Fuganti-Pagliarini et al. (2017), cuja a expressão também foi maior nos genótipos convencionais.

As respostas obtidas pelas linhagens 16T-0005 e 16T-0010 podem ser explicadas quando comparadas ao parental 1Ea2939. Os genótipos 16T-0005, 16T-0010 e 1Ea2939 apresentaram uma expressão menor em comparação com a suas respectivas condições controle (Figura 16). Comparando as linhagens 16T-0005 e 16T-0010 utilizando como calibrador o genótipo 1Ea2939, a linhagem 16T-0005 e a linhagem 16T-0010 apresentaram uma expressão superior na condição controle e em relação a estressada, enquanto a 1Ea2939 apresentou uma expressão mais estável em ambas as condições. Este resultado pode explicar o fato de as linhagens apresentarem uma menor ativação dos mecanismos fisiológicos de tolerância ao déficit hídrico, quando comparados à parental 1Ea2939, que conseguiu manter uma maior quantidade de água disponível do substrato, a partir da redução mais precoce da perda de água para o ambiente com relação as linhagens 16T-0005 e 16T-0010.

A altura de plantas é uma característica complexa e que pode ser influenciada por diversos fatores. Apesar de na literatura o promotor constitutivo *CaMV 35S* ser associado a ocorrência de redução no crescimento (KASUGA et al., 2004; MORRAN et al., 2011). Neste trabalho, os genótipos que contêm a construção *pBI35S-AREB1* não apresentaram redução no seu crescimento com relação aos seus parentais, tanto na situação controle, quanto estressada. Em trabalhos prévios, com a mesma construção (BARBOSA et al., 2013; MARINHO et al., 2016) também foram obtidos resultados em que não houve redução na taxa de crescimento das plantas. A característica de altura de plantas é importante para permitir a colheita mecanizada,

considerada adequada quando se encontra entre 60 a 120 cm (JOHNSON; CARTTER; HARTWIG, 1967).

Os genótipos que apresentaram maior crescimento também apresentaram uma média maior no número de nós por planta, em comparação com os demais genótipos. O número de nós pode ser relacionado a maiores rendimentos, sendo esta uma característica associada ao número de vagens, uma vez que, quanto maior o número de nós, maior é a capacidade da planta em sustentar as vagens, as quais desempenham um papel fundamental na determinação dos rendimentos (EGLI, 2013). O período de desenvolvimento da planta em que ocorre o estresse por déficit hídrico, tende a afetar de maneira diferente as características da planta. A ocorrência de estresse no período vegetativo, tende a afetar principalmente o crescimento e o número de nós. Já a ocorrência deste tipo de estresse no período reprodutivo, irá afetar principalmente características que impactam diretamente na produtividade, como o abortamento floral, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de grãos (DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000).

O desenvolvimento e o número de vagens podem sofrer grandes reduções com a ocorrência de déficit hídrico. Esta redução está ligada ao transporte de sacarose das folhas para as vagens, pois a redução da concentração de sacarose na folha, reduz a exportação de sacarose para as vagens (LIU; JENSEN; ANDEREN, 2004). Segundo Huber; Rufty; Kerr. (1984), a taxa de exportação de sacarose para as vagens é linearmente correlacionada com a taxa fotossintética.

Neste trabalho, os genótipos que apresentaram maior número de vagens com sementes, conseqüentemente, também apresentaram uma taxa fotossintética maior em relação aos demais.

De maneira geral, em casa de vegetação, os genótipos GM apresentaram melhores resultados nos componentes de rendimento, principalmente o genótipo 1Ea2939 e a linhagem 16T-0010. O melhor desempenho destes genótipos pode estar relacionado com a característica de uso conservativo da água disponível, mesmo que estejam sob condições de boa disponibilidade hídrica. Esta maior eficiência pode ser confirmada com as respostas fisiológicas destes genótipos, que, ao final do déficit hídrico apresentaram maiores taxas de g_s , fotossíntese e taxa transpirativa.

7. CONCLUSÃO

A análise de segregação indicou que a seleção indireta, com a utilização do herbicida glufosinato de amônio, confirmou a ocorrência de segregação mendeliana 3:1. A utilização de um gene marcador que confere resistência a herbicidas foi eficiente na seleção das plantas positivas e negativas, isto possibilita que o avanço de gerações possa ocorrer sem a necessidade de confirmar a presença da sequência de DNA por ferramentas diretas.

Os genótipos provenientes das populações 16T-0005 e 16T-0010 originados, respectivamente, a partir dos cruzamentos entre os genótipos LS93-0375 e BMX Desafio RR com a linhagem GM 1Ea2939, apresentaram maior tolerância ao déficit hídrico quando comparados aos seus parentais, provavelmente devido a maior eficiência no uso da água disponível no substrato, principalmente devido à melhor regulação da g_s e da taxa transpirativa.

Os dados obtidos para as linhagens 16T-0005 e 16T-0010 indicam maior tolerância ao déficit hídrico devido a introgressão do gene AtAREB proveniente do parental GM 1Ea2939.

8. REFERÊNCIAS

- ACQUAAH, G. **Principles of Plant Genetics and Breeding**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201–212, 15 jun. 2010.
- AHMAD, P. et al. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 524–540, 2012.
- ALMEIDA, L. A. DE et al. Melhoramento da soja para regiões de baixas latitudes. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, p. 15, 1999.
- ANJUM, S.; XIE, X.-Y.; WANG, L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011.
- ASSENG, S. et al. Crop physiology, modelling and climate change: impact and adaptation strategies. In: **Crop Physiology - Applications for Genetic Improvement and Agronomy**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 511–544.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Abscisic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 3–16, 15 jan. 2017.
- BARBOSA, E. G. G. et al. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 719–730, 21 jun. 2013.
- BARRS, H.; WEATHERLEY, P. A Re-Examination of the Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 413, 1962.
- BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao melhoramento de plantas. In: **Melhoramento de plantas**. [s.l: s.n.]. p. 1–9.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 411–424, 20 mar. 2008.
- BLAKE, G. R.; HARTGE, K. H. Bulk density. In: **Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods**. [s.l: s.n.]. p. 363–375.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. A soja no Brasil: história e estatística. **EMBRAPA-CNPSO. Documentos**, v. 21, p. 61, 1987.
- BONEH, Uri et al. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. **Plant science**, v. 187, p. 89-96, 2012.
- BRIM, C. A. A Modified Pedigree Method of Selection in Soybeans. **Crop Science**, v. 6, n. 2, p. 220, 1966.
- BUSK, P. K.; PAGÈS, M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. **Plant Molecular Biology**, v. 37, n. 3, p. 425–435, 1998.
- CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of experimental Botany**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 3, p. 239, 2003.

CHOI, H. et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1723–30, 21 jan. 2000.

CORRÊA, L. G. G. et al. The Role of bZIP Transcription Factors in Green Plant Evolution: Adaptive Features Emerging from Four Founder Genes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e2944, 13 ago. 2008.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P.-A. Global Synthesis of Drought Effects on Food Legume Production. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127401, 10 jun. 2015.

DARYANTO, S.; WANG, L.; JACINTHE, P.-A. Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. **Agricultural Water Management**, v. 179, p. 18–33, 1 jan. 2017.

DEL BLANCO, I. A. et al. Physiological Performance of Synthetic Hexaploid Wheat-Derived Populations. **Crop Science**, v. 40, n. 5, p. 1257, 2000.

DESCLAUX, Dominique; HUYNH, Tung-Thanh; ROUMET, Pierre. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, v. 40, n. 3, p. 716-722, 2000.

DESTRO, D. Photoperiodism and genetic control of the long juvenile period in soybean: A review. **Crop Breed. Applications**, p. 72–92, 2001.

DOYLE, J. J.; DICKSON, E. E. Preservation of Plant Samples for DNA Restriction Endonuclease Analysis. **Taxon**, v. 36, n. 4, p. 715, nov. 1987.

EGLI, D. B. The relationship between the number of nodes and pods in soybean communities. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1668-1676, 2013.

EHRLER, W. L. et al. Wheat Canopy Temperature: Relation to Plant Water Potential. **Agronomy Journal**, v. 70, n. 2, p. 251, 1978.

FEHR, W. R. et al. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill 1. **Crop science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FEHR, Walter. **Principles of cultivar development: theory and technique**. Macmillan Publishing Company, 1991.

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

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S. L.; ROCK, C. D. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. **The Plant Cell**, p. 15–45, 2002.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, v. 89, n. 2, p. 183–189, 1 fev. 2002.

FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, n. 4, p. 509–525, 18 jul. 2011.

FUGANTI-PAGLIARINI, Renata et al. Characterization of soybean genetically modified for drought tolerance in field conditions. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 448, 2017.

GALLARDO, M.; TURNER, N. C.; LUDWIG, C. Water relations, gas exchange and abscisic acid content of *Lupinus cosentinii* leaves in response to drying different proportions of the root system. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 7, p. 909–918, 1 jul. 1994.

GAO, S.-Q. et al. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 6, p. 537–553, 18 abr. 2011.

GATES, D. M. Transpiration and leaf temperature. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 211–238, jun. 1968.

GIRAUDAT, J. et al. Current advances in abscisic acid action and signalling. In: **Signals and Signal Transduction Pathways in Plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 321–341.

HARTWIG, E. E.; KIIHL, R. A. S. Identification and utilization of a delayed flowering character in soybeans for short-day conditions. **Field Crops Research**, v. 2, n. C, p. 145–151, 1 jan. 1979.

HENSON, I.; JENSEN, C.; TURNER, N. Leaf Gas Exchange and Water Relations of Lupins and Wheat. III. Abscisic Acid and Drought-Induced Stomatal Closure. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 5, p. 429, 1989.

HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; GRILL, E. Relay and control of abscisic acid signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 470–479, 1 out. 2003.

HIRAKURI, M. H. Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16 125. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, n. c, 2016.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/990000/1/Oagronegociodasojanoscontextosmundialebrasileiro.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

HU, H.; XIONG, L. Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 715–741, 29 abr. 2014.

HUGHES, M. K.; DIAZ, H. F. Climate variability and change in the drylands of Western North America. **Global and Planetary Change**, v. 64, n. 3–4, p. 111–118, 1 dez. 2008.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408–421, out. 1970.

JAMES, C.; KRATTIGER, A. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology. **ISAAA Briefs**, v. 1, n. 1, p. 31, 1996.

KIRIGA, W. J.; YU, Q.; BILL, R. Breeding And Genetic Engineering Of Drought- Resistant Crops. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 9, p. 7–12, 2016.

LI, Y. et al. Improving water-use efficiency by decreasing stomatal conductance and transpiration rate to maintain higher ear photosynthetic rate in drought-resistant wheat. **Crop Journal**, v. 5, n. 3, p. 231–239, 1 jun. 2017.

LIU, W.; YUAN, J. S.; STEWART, C. N. **Advanced genetic tools for plant biotechnology** *Nature Reviews Genetics*, 9 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrg3583>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

LIU, Fulai; JENSEN, Christian R.; ANDERSEN, Mathias N. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. **Field crops research**, v. 86, n. 1, p. 1-13, 2004.

LOBELL, D. B. Changes in diurnal temperature range and national cereal yields. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 145, n. 3–4, p. 229–238, 15 ago. 2007.

MANAVALAN, L. P. et al. Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 7, p. 1260–1276, 1 jul. 2009.

- MARCOLINO-GOMES, Juliana et al. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. **PLoS one**, v. 10, n. 9, p. e0139051, 2015.
- MARINHO, J. P. et al. Characterization of Molecular and Physiological Responses Under Water Deficit of Genetically Modified Soybean Plants Overexpressing the AtAREB1 Transcription Factor. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 2, p. 410–426, 29 abr. 2016.
- MASUDA, T.; GOLDSMITH, P. D. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 12, n. 4, 2009.
- MIYASAKA, S. et al. Variedades de soja indiferentes ao fotoperiodismo e tolerantes a baixas temperaturas. **Bragantia**, v. 29, n. unico, p. 169–173, jan. 1970.
- MIYASHITA, K. et al. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n. 2, p. 205–214, 1 abr. 2005.
- MORGAN, J. M. Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 299–319, 28 jun. 1984.
- MURAKAMI, T. et al. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 205, n. 1, p. 42–53, out. 1986.
- OLIVEIRA, M. A. J. DE et al. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 1, p. 59–63, 2002.
- OYA, T. et al. Drought Tolerance Characteristics of Brazilian Soybean Cultivars. **Plant Production Science**, v. 7, n. 2, p. 129–137, 3 jan. 2004.
- PIRZAD, A. et al. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in Chamomilla, Matricaria L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2483–2488, 2011.
- QIU, L.; CHANG, R. The origin and history of soybean. In: **The soybean: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2010. v. 5p. 1–23.
- RAGHAVENDRA, A. S. et al. ABA perception and signalling. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 7, p. 395–401, 1 jul. 2010.
- RAY, J. D. et al. Genetic control of a long-juvenile trait in soybean. **Crop Science**, v. 35, n. 4, p. 1001–1006, 1995.
- RAY, J. D.; SINCLAIR, T. R. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 325, p. 1381–1386, 1 ago. 1998.
- REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. **Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants** *Journal of Plant Physiology* Wiley/Blackwell (10.1111), , 1 jan. 2004a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01918.x>>. Acesso em: 26 mar. 2018
- REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. **Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants** *Journal of Plant Physiology* Elsevier Current Trends, , 1 abr. 2004b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166996800073>>. Acesso em: 26 mar. 2018

SALINET, L. H. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. **Universidade de São Paulo**, p. 0–75, 2009.

SANTOS, R. S. DOS et al. Avaliação da relação seca/produtividade agrícola em cenário de mudanças climáticas. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, n. 2, p. 313–321, jun. 2011.

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

SHEARD, Laura B.; ZHENG, Ning. Plant biology: signal advance for abscisic acid. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 575, 2009.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 6 nov. 2007.

SINGH, G. **The soybean: botany, production and uses**. [s.l.] CABI, 2010.

THE INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS (ISAAA). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. **ISAAA Briefs**, n. Brief 52, p. 317, 2016.

TOLIENG, V. et al. **Identification and lactic acid production of bacteria isolated from soils and tree barks** *Malaysian Journal of Microbiology*, 2017. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/990000/1/Oagronegociodasojanoscontextosmundialebrasileiro.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2018

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

TURNER, N. C.; JONES, M. M. Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. **Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation.**, p. 87–103, 1980.

TURNER, N. C.; WRIGHT, G. C.; SIDDIQUE, K. H. M. Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. **Advances in Agronomy**, v. 71, p. 193–231, 1 jan. 2001.

UMEZAWA, Taishi et al. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 106, n. 41, p. 17588-17593, 2009.

UNO, Y. et al. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11632–11637, 10 out. 2000.

USDA. **Oilseeds: World Markets and Trade** *USDA Foreign Agricultural Service*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

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

VALLIYODAN, B. et al. Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 8, p. erw433, 7 dez. 2016.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. **and Technology Corporation Japan Annu. Rev. Plant Biol**, v. 57, p. 781–803, 2006.

YANG, S. et al. Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. **Molecular Plant**, v. 3, n. 3, p. 469–490, 1 maio 2010.

YOSHIDA, T. et al. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, v. 61, n. 4, p. 672–685, fev. 2010.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 133–139, 1 out. 2014.

ZONTA, Elio Paulo; MACHADO, Amauri Almeida; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistema de análise estatística para microcomputadores-SANEST. **Pelotas: UFPel**, v. 1, 1984.

ZHANG, J.; SCHURR, U.; DAVIES, W. J. Control of Stomatal Behaviour by Abscisic Acid which Apparently Originates in the Roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, n. 7, p. 1174–1181, 1 jul. 1987.

ZHAO, Yan et al. Hereditary behavior of bar gene cassette is complex in rice mediated by particle bombardment. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 9, p. 824-835, 2007.

ZHU, J.-K. SALT AND DROUGHT STRESS SIGNAL TRANSDUCTION IN PLANTS. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 247–273, 28 jun. 2002.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST–Sistema de análise estatística para microcomputadores. **Pelotas: UFPel**, 1984.

ANEXO

ANEXO 1. Resumo da análise de variância dos componentes de rendimento, umidade gravimétrica do solo (UGS) e medidas fisiológicas para os genótipos (G) GM 1Ea2939, 16T-0005, 16T-0010, BMX-Desafio RR, LS93-0375 e BR16 sob as condições controle (C) e déficit hídrico (DH).

Variável	Quadrado médio						
	Blocos	G	CH	GxCH	Res.	CV%	Média
GL	8	5	1	5	88		
C. de rendimento							
Altura de planta	167.0	23324***	875.0**	2807.4***	147.7	15.7	77.4
nº de nós	5.84	481.9***	7.75	14.29	7.48	17.6	15.53
Vagens com sem.	2853.0**	42987***	215.0	2115.0	1065.0	33.7	96.9
Vagens sem sem.	55.4***	440.3***	254.2***	47.5**	16.2	62.9	6.4
nº de sementes	11573.0	174665***	884.0	2908.0	6207.0	37.1	212.3
Peso de grãos	294.9*	5828.9***	1.1	267.8	129.40	35.3	32.2
UGS	5.9	32.1***	8653.1***	4.8	3.7	13.4	14.3
Medidas Fisiológicas							
Cond. Estomática	2.53E-03	1.6E-02***	4.63***	3.1E-02***	1.30E-03	12.7	0.29
Fotossíntese	17.06***	227.36***	2220.8***	223.8***	4.76	18.7	11.7
Concentração Int. de CO ₂	436.1	31011***	45704***	34684***	557.2	7.7	306.2
TRA	100.2**	2249.6***	14020***	2026***	32	7	80.7
Transpiração	3.84E-06***	8.19E-06***	4.75E-04***	1.08E-05***	5.92E-07	20.1	3.82E-03
Temperatura da Folha	7.93***	1.31***	107.91***	1.76***	0.15	1.27	30.37