



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CIBELLE ENGELS

**“ESTUDOS FISIOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E  
MOLECULARES DE CULTIVARES DE SOJA SENSÍVEL E  
TOLERANTE À SECA E DE LINHAGEM TRANSGÊNICA**

***RD29A:***

***DREB2A CA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSES  
ABIÓTICOS”***

CIBELLE ENGELS

**“ESTUDOS FISIOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E  
MOLECULARES DE CULTIVARES DE SOJA SENSÍVEL E  
TOLERANTE À SECA E DE LINHAGEM TRANSGÊNICA  
*RD29A:*  
*DREB2A* CA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSES  
ABIÓTICOS”**

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

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
Co-orientador: Dra. Fabiana Aparecida Rodrigues  
Co-orientador: Dra. Renata Fuganti-Pagliarini

Londrina  
2014

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

E57e Engels, Cibelle.

Estudos fisiológicos, agrônômicos e moleculares de cultivares de soja sensível e tolerante à seca e de linhagem transgênica RD29A: DREB2A CA sob condições de estresses abióticos / Cibelle Engels. – Londrina, 2014.

167f.:il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Resistência à seca – Teses. 3. Genética molecular – Teses. 4. Biologia molecular – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agronômico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:633.34

CIBELLE ENGELS

**“ESTUDOS FISIOLÓGICOS, AGRONÔMICOS E MOLECULARES DE  
CULTIVARES DE SOJA SENSÍVEL E TOLERANTE À SECA E DE  
LINHAGEM TRANSGÊNICA *RD29A*:  
*DREB2A* CA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSES ABIÓTICOS”**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EMBRAPA/Soja

---

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EMBRAPA /Agroenergia

---

Prof Dr. Luiz Filipe Protásio Pereira  
Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR

---

Dr. Leonardo Cesar Ferreira  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EMBRAPA/Soja

---

Dr. José Renato Bouças Farias  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EMBRAPA/Soja

Londrina, 26 de fevereiro de 2014.

*À Deus que me deu saúde, força, me criou e amou.  
Ao meu marido, meus pais e família que são a minha base, me amam  
incondicionalmente e me apoiam diante das adversidades da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, meu mantenedor e protetor;

Ao meu esposo Ademir de Oliveira Ferreira que me apoiou em todas as etapas me dando conselhos, ajudando e amando e à minha família que investe na minha vida tempo, carinho e atenção;

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de ser aluna do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular e pelo aprendizado gerado pelo seu corpo docente e em particular ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular;

À EMBRAPA Soja que disponibilizou os laboratórios e pessoas capacitadas que me auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho;

Ao meu orientador, Alexandre Lima Nepomuceno, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e pela sua orientação e às minhas co-orientadoras Dra Fabiana Rodrigues e Dra Renata Fuganti-Pagliarini por me ajudarem nas etapas da Tese;

Ao meu supervisor técnico Kensuke Kodaira que me ensinou, auxiliou e acompanhou a pesquisa realizada no JIRCAS;

Ao JIRCAS e ao laboratório da Dra. Kazuko Yamaguchi-Shinozaki por permitirem que realizasse parte da minha pesquisa;

À JICA e JST pela oportunidade de ir ao Japão desenvolver uma parte da minha pesquisa e à CAPES pela bolsa cedida durante os quatro anos;

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação Dra. Ana Lúcia Dias e à Sueli que estiveram disponíveis em todos os momentos;

À Dra Josirley de Fátima Corrêa Carvalho que me auxiliou, ensinou e ajudou nos experimentos de fisiologia, além de sempre estar disposta a me ouvir e dar conselhos.

Aos colegas da Equipe de Ecofisiologia que me auxiliaram nos experimentos fisiológico e agrônômico e aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Ecofisiologia e Agrometeorologia da EMBRAPA soja;

Àqueles que de certa forma me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

ENGELS, C. **Estudos fisiológicos, agronômicos e moleculares de cultivares de soja sensível e tolerante à seca e de linhagem transgênica RD29A: DREB2A CA sob condições de estresses abióticos.** 2014. 167 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

## RESUMO

A cultura da soja está exposta a várias condições ambientais adversas, e dentre estas a seca é responsável por grandes perdas na produtividade. Na safra 2011/2012 a redução de produção brasileira foi de 8,94 milhões de toneladas. Com o aquecimento global, os eventos de déficit hídrico tendem a aumentar e, por esta razão, estudos de caracterização e obtenção de cultivares mais tolerantes à seca e ao calor são necessários. Assim, o presente estudo objetivou a caracterização de tolerância à seca de duas cultivares brasileiras, uma sensível, BR 16, e outra tolerante, Embrapa 48, e de uma linhagem transgênica *AtDREB2A CA* (*Dehydration Responsive Element Binding*), por meio de estudos moleculares, fisiológicos e agronômicos. Os resultados indicaram que a cultivar BR 16 possui vigor precoce, a Embrapa 48 tolerância à seca e juntamente com a *AtDREB2A CA* uso conservativo de água em condições de déficit hídrico. Os resultados agronômicos da safra 2011/2012 demonstraram que a cultivar Embrapa 48 possui maiores rendimentos e que apesar da linhagem transgênica *AtDREB2A CA* não apresentar valores superiores no rendimento, diversos parâmetros de produtividade apresentaram incrementos quando comparados à sua isolinha BR 16. Em outro estudo de caracterização molecular, promotores de genes responsivos ao déficit hídrico moderado e severo induzidos na cultivar tolerante Embrapa 48 e identificados através de microarranjo de DNA foram selecionados e um ensaio de expressão transiente realizado. Os promotores selecionados foram dos genes *LTI*, *HSP26/42*, *Mat1*, *Mat9*, e *Glyma11g16120*. Análises *in silico* demonstraram que os promotores que apresentaram maior ativação por ABA no ensaio de expressão transiente apresentavam mais *cis*-elementos de resposta ao déficit hídrico ou ao ABA. Os resultados obtidos sugerem que os promotores dos genes *LTI*, *Mat1* e *Mat9* são promotores candidatos a serem utilizados na biotecnologia para estudos de ciência básica e aplicada, como a obtenção de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes à seca. A cultivar tolerante à seca Embrapa 48 foi ainda caracterizada através da análise da expressão de genes marcadores em resposta ao déficit hídrico e estresse a alta temperatura isolados e combinados em folhas, caules e raízes. Os resultados demonstraram diferentes perfis de expressão gênica tanto espaciais quanto entre os tratamentos. Os marcadores de expressão identificados para o déficit hídrico isolado em folhas foram os genes *HSP18.2*, *HSP70* e a calmodulina, em caules, o *Mat9* e em raízes, *LEA18*. No estresse por alta temperatura isolado os marcadores de expressão foram *HSP70* e transaldolase em folhas, transaldolase em caules e *LEA18* em raízes. Nos tratamentos de déficit hídrico e alta temperatura combinados os marcadores foram *Mat9* e *HSP70* em folhas, transaldolase em caules e *LEA18* em raízes.

**Palavras-chave:** Tolerância à seca. Uso conservativo de água. Marcadores de expressão. *AtDREB2A CA*. Promotores. ABA.

ENGELS, C. **Physiological, agronomic and molecular studies of sensitive and drought tolerant soybean cultivars and transgenic line *rd29A: DREB2A CA* under conditions of abiotic stress.** 2014. 167 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2014.

## ABSTRACT

Soybean plant is exposed to various adverse environmental conditions, and among them drought is responsible for major losses in productivity. Only in the 2011/2012 crop season production was reduced to 8.94 million tons. Due to global warming, drought events are likely to increase and for this reason, characterization studies aiming to obtain cultivars more tolerant drought and heat are needed. Thus, the present study aimed to characterize two soybean cultivars, one drought-sensitive BR 16, one drought-tolerant, Embrapa 48, and a transgenic line *AtDREB2A CA* (Dehydration Responsive Element Binding), by molecular, physiological and agronomic studies. Results indicated that BR 16 cultivar presents early vigor, Embrapa 48 drought tolerance and together with *AtDREB2A CA* GM line, conservative water use in well-water conditions. Agronomic results of 2011/2012 crop season showed that the cultivar Embrapa 48 has higher yields and that despite the transgenic line *AtDREB2A CA* did not show superior yield, several productivity parameters were increased when compared to its isoline BR 16. In another molecular characterization study, promoters from genes responsive to moderate and severe water deficit, induced in the drought-tolerant cultivar Embrapa 48 and identified through microarray were selected and a transient assay was performed. Selected promoters were *LTI*, *HSP26/42*, *Mat1*, *Mat9*, and *Glyma11g16120*. *In silico* analyses showed that the promoters which presented higher ABA activation in the transient assay, also presented more *cis*-elements related to water deficit or ABA. Obtained results suggests that promoters from genes *LTI*, *Mat1* and *Mat9* are candidates to be used in biotechnology basic and applied science studies, such as the development of genetically modified plants more tolerant to drought or to other adverse environmental conditions. The drought-tolerant cultivar Embrapa 48 was further characterized by analyzing the expression of marker genes in response to water deficit and high temperature, applied isolated and combined into leaves, stems and roots. Results showed different gene expression profiles in both spatial and between treatments. Expression markers identified for water deficit in leaves were *HSP18.2*, *HSP70* and calmodulin, in stems, gene *Mat9* and in roots *LEA18*. In the high temperature treatment, expression markers were *HSP70* and transaldolase in leaves, transaldolase in stems and *LEA18* in roots.

**Key words:** Drought tolerance. Conservative water use. Expression markers. *AtDREB2A CA*. Promoters. ABA.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figure 1. BR 16 (A), D2A (B) and Embrapa 48 (C) plants in the V7-V8 stage under control conditions (left) and drought stress conditions at 17 DAWS (right).....84
- Figure 2. Transpiration (g day<sup>-1</sup>) of BR16, Embrapa 48 and D2A plants under well-irrigated or drought stressed conditions ( $p < 0,05$ ;  $n = 4 \pm$  standard error of the mean). (A) Control plants and, (B) Treated plants. DAS means days after sowing and DAWS means days after water stress .....85
- Figure 3. Gas Exchange of BR16, Embrapa 48 and D2A plants ( $n = 6 \pm$  standard error of mean) analyzed at 17 DAWS in (A) and 10 DAWS in (B). Same uppercase letters (comparison between cultivars under control or drought stressed conditions) and lowercase letters (comparison between control and drought stressed conditions within a given cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ).....86
- Figure 4. Analysis of soybean plant growth at 17 DAWS. (A) Height (cm); (B) Number of Nodes; (C) Number of Leaves; (D) Leaf Area (cm<sup>2</sup>). Same uppercase letters (comparison between genotypes within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ;  $n = 6 \pm$  standard error of the mean).....87
- Figure 5. (A) Water potential; (C) Electrolyte Leakage and (E) RWC analyzed at 10 DAWS and (B) Osmotic Potential and (D) Leaf Succulence analyzed at 17 DAWS. Same uppercase letters (comparison between cultivars within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ;  $n = 6 \pm$  standard error of the mean) .....89

Figure 6. Growth characteristics of soybean plants ( $n = 6 \pm$  standard error of the mean). (A) Shoot Dry Matter (g); (B) Root Dry Matter (g); (C) Relative Growth Rate ( $g\ g^{-1}\ day^{-1}$ ); (D) Dry-Matter Gain (g); (E) Reduction in Growth (%). Same uppercase letters (comparison between cultivars within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$  .....90

Figure 7. Growth parameters in BR 16, Embrapa 48 and D2A plants. Parameters (A) (Leaf Area,  $cm^2$ ) and (B) (Leaf Area Index,  $cm^2$ ) were analyzed in plants in the R2-R3 stage, and (C) (Shoot Fresh Matter, g), (D) (Shoot Dry Matter, g), (E) (Height, cm) and (F) (Number of Nodes) were analyzed at harvest, stage R8. NI, I, VS and RS mean natural conditions, irrigated, water stress applied in the vegetative stress and under reproductive stress, respectively. Same uppercase letters (comparison between the cultivars within a water regime) and lowercase letters (comparison between the water regimes within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ .....92

Figure 8. Productivity parameters analyzed at harvest, stage R8, of BR 16, Embrapa 48 and D2A plants. NI, I, VS and RS mean natural conditions, irrigated, water stress applied in the vegetative stress and under reproductive stress, respectively. (A) Number of Pods; (B) Number of Seeds; (C) Apparent Harvest Index; (D) Dry Matter of 100 Seeds (g); (E) Yield (Kg/ha). Same uppercase letters (comparison between the cultivars within a water regime) and lowercase letters (comparison between the water regimes within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$  .....93

Supplementary Figure S1. The mean daily vapor pressure (kPa) deficit (VPD) recorded over the experimental period in the greenhouse. DAS means days after sowing and DAWS means days after water stress ..... 105

## CAPÍTULO II

- Figura 1. Diagrama de Venn mostrando os conjuntos de genes diferencialmente expressos em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico moderado (DM – 2 dias de desidratação) e déficit hídrico severo (DS – 6 dias de desidratação). Déficit Hídrico Moderado (total de transcritos diferencialmente expressos = 5.924) e Déficit Hídrico Severo (total de transcritos diferencialmente expressos = 18.149) ..... 114
- Figura 2. Heat Map apresenta as funções moleculares de 27 transcritos up regulados (vermelho) e down regulados (azul). Parte colorida apresenta a frequência (%) de genes responsivos à desidratação nas plantas avaliadas após dois (W2) e seis dias (W6) sob déficit hídrico. .... 115
- Figura 3. (A) Cultivares Embrapa 48, Nourin2 e Williams 82 submetidas ao déficit hídrico moderado (dois e quatro dias sem irrigação) e severo (seis dias sem irrigação). (B) Análise de expressão gênica realizada por qPCR usando a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os genes avaliados foram: *Homeobox-leucine zipper protein* (Glyma16g02390); *Expansin-like B1-like* (Glyma17g15710); *Seed maturation protein PM34* (Glyma10g29630); *Hsp26/Hsp42* (Glyma14g11420); *Asparagine Synthetase* (Glyma11g27720) e Glyma11g16120. Letras maiúsculas (comparação entre cultivares dentro de regime hídrico) e minúsculas (comparação entre regime hídrico dentro de cultivares) iguais indicam que não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ;  $n = 9 \pm$  erro padrão da média). O eixo X (ordenada) representa a expressão relativa normalizada ..... 116
- Figura 4. (A). *Cis*-elementos responsivos ao ABA detectados pelos programas Plant Care e Plan Pan. (B). Atividade Relativa dos plasmídeos analisados (expressão do plasmídeo efetor induzido por ABA e comparado com a expressão do mesmo plasmídeo em etanol) por ensaio transiente realizado em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. O experimento foi realizado em triplicata, SD

= 3. Os protoplastos foram co-transfectados com o plasmídeo Emerald Luc, utilizado como normalizador da eficiência da transfecção, e com as construções efetoras. O plasmídeo com o promotor RD29B foi utilizado como controle do experimento. HSP26/42, *Heat Shock Protein 26/42*; Mat9, *Maturation associated protein 9*; Mat1, *Maturation associated protein 1*, LTI *Low Temperature Induced*; GUS,  $\beta$ -glucoronidase; Nos-T, *Nopaline synthase terminator* ..... 120

Figura 5. Análise de promotores. Os Glyma09g31740 (*Mat9*); Glyma11g16120; Glyma14g11420 (*HSP26/42*); Glyma20g29770 (*LIT*) e Glyma07g10030 (*Mat1*) foram submetidos ao Genevestigator para predizer, *in silico*, a expressão diferencial destes genes em diferentes condições adversas. (A) comparação sob estresses abióticos e bióticos; (B) quanto ao estágio de desenvolvimento; (C) em diferentes partes anatômicas ..... 123 e 125

### CAPÍTULO III

Figura 1. Esquema do delineamento experimental. As plantas cresceram em casa de vegetação com desenho experimental inteiramente casualizado contendo 3 replicatas biológicas. (I) O tratamento de Déficit Hídrico (DH) foi aplicado em casa de vegetação pela suspensão da irrigação por 2, 4 e 6 dias; (II) O tratamento de Alta Temperatura (AT) foi aplicado pela transferência das plantas para câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h luz (28°C)/12 h escuro (25°C). Depois de 12 h de aclimatação, as plantas controle foram mantidas a 25°C enquanto as plantas submetidas ao estresse foram submetidas a 42°C por 2, 6 e 12 h; (III) No tratamento de Déficit Hídrico + Alta Temperatura (DH + AT), as plantas submetidas a 2 dias sob DH (casa de vegetação) foram transferidas para câmara de crescimento a 42°C e mantida nessa condição por 2, 6 e 9 h. C representa amostras em condições controle e T amostras tratadas ..... 141

Figura 2. As trocas gasosas das plantas BR16 e Embrapa 48 foram analisadas sob condições bem irrigadas e sob déficit hídrico durante cinco dias consecutivos ( $p < 0,05$ ;  $n = 3 \pm$  erro padrão da média). (A) Taxa Fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); (B) Condutância Estomática ( $\text{H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e (C) Eficiência de Uso de Água Intrínseco ( $\text{EUA}_{\text{intr.}} \text{ mmol C/mol H}_2\text{O}$ )..... 148

Figura 3. Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as cultivares (comparação dentro do mesmo gene e mesmo tempo). Folhas sob (A-D) déficit hídrico; (E-G) alta temperatura; (H-M) déficit hídrico e alta temperatura combinados ..... 150

Figura 4. Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em

comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0.0,5$ ) entre as cultivares (comparação dentro do mesmo gene e mesmo tempo). Caules sob (A) déficit hídrico; (B) alta temperatura; (C-F) déficit hídrico e alta temperatura combinados ..... 151

Figura 5. Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0.0,5$ ) entre as cultivares (comparação dentro do mesmo gene e mesmo tempo). Raízes sob (A-C) déficit hídrico; (D) alta temperatura; (E) déficit hídrico e alta temperatura combinados ..... 151

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1. *Cis*-elementos identificados em genes que foram altamente expressos em plantas de soja sob condições de déficit hídrico. Glyma09g31740 (Dehidrina Mat9); Glyma11g16120 (função desconhecida); Glyma07g10030 (Dehidrina Mat9); Glyma20g29770 (proteína LTI) ..... 118
- Tabela Suplementar 1. Sequência de iniciadores (Forward e Reverse) dos genes-alvo e gene referência utilizados nas reações de RT-qPCR ..... 136

### CAPÍTULO III

- Tabela 1. Condições experimentais nas quais os respectivos genes alvos foram analisados. As sequências dos genes e respectivos iniciadores utilizados nas reações de amplificação são apresentados. Glyma09g31740 (NP\_001238185) e Glyma04g01130 (NP\_001240106) codificam a proteína associada à maturação 9 (*maturation-associated protein 9\_Mat9*) e a proteína de resposta inicial a desidratação 14 (*early response to dehydration 14 protein \_ERD14*), respectivamente; Glyma14g06900 (XP\_003519372) e Glyma17g08020 (XP\_003549537) transcrevem as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins\_HSP18.2* e *HSP70*); Glyma17g17860 (NP\_001238313) transcreve a proteína de embriogênese abundante tardia 18 (*Late Embryogenesis Abundant \_LEA18*), Glyma05g33340 (NP\_001237926) que transcreve uma proteína transaldolase-like (EC EC 2.2.1.2) e Glyma13g09550 (XP\_003542013) que transcreve uma proteína de ligação ao cálcio (CaM). As análises de expressão foram realizadas utilizando como gene referência o *GmRNAr18S* (Acesso No.: X02623.1) ..... 143

Tabela 2. Marcadores de expressão para déficit hídrico. Os genes foram selecionados a partir dos resultados mais significativos observados em cada condição experimental avaliada. Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e Calmodulina (Glyma13g09550).....156

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A –Taxa fotossintética;
- ABA - Ácido abscísico;
- ABC G - *ATP-binding cassette* – cassete ABA-ligante;
- ABF/AREB/ABI5 - *ABRE-binding factors/ ABRE-binding/ABA insensitive 5* – fatores de ligação ao ABRE/ ABRE-ligante/ insensível ao ABA 5;
- ABRE- *ABA-binding responsive element* - elemento de ligação responsivo ao ABA;
- Ago 1 - *Argonaute 1* – argonauta 1;
- AHI -*Apparent harvest index* – índice de colheita aparente;
- AJ - Ácido Jasmônico;
- AREBs - *ABRE-binding factors* – fatores ABRE ligantes;
- AS - Ácido salicílico;
- AtDREB1A* - Gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*;
- AtDREB2A CA* – Forma ativa constitutiva do gene *DREB2A* de *Arabidopsis thaliana*;
- AtGolS1* - *Galactinol synthase 1* – galactinol sintase 1;
- AtGolS3* - *Galactinol synthase 3* – galactinol sintase 3;
- bZIP - Fatores de transcrição zíper de leucina;
- C - *Well-irrigated conditions* – condições bem irrigadas;
- CaM – Calmodulina;
- CAT – Catalase;
- CBF - *C-repeat-binding factor* – fator de ligação ao C-repeat;
- CDPK - *Calcium dependent protein kinase* - proteínas quinase dependente de cálcio;
- CEs - *Coupling elements* – elemento de acoplamento;
- ChIP - *Chromatin immunoprecipitation* – imunoprecipitação de cromatina;
- Ci - *Internal CO<sub>2</sub> concentration* – concentração interna de CO<sub>2</sub>.
- COR15A - *Cold-regulated 15A* – regulado pelo frio 15A;
- CRT - *C-Repeat e low-temperature-responsive* – C-repeat e responsivo a baixa temperatura;
- Ct – Limiar do ciclo do PCR quantitativo;
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança;
- C3HC4 RING – Domínio protéico;
- DAS - *Days after sowing* – dias após a semeadura;

DAWS - *Days after water stress* - dias após déficit hídrico;

DBF - *DNA-Binding proteins* – Proteína de Ligação de DNA;

DCL – Enzima *Dicer-like*;

DE – Densidade estomática;

DM – Déficit hídrico Moderado;

DMG - *Dry-matter gain* (g) – ganho da matéria seca (g);

DMGC - *Dry-matter gain* (g) of the control plant - ganho da matéria seca (g) de plantas controle;

DMGS - *Dry-matter gain* (g) of the plants under water stress - ganho da matéria seca (g) de plantas sob déficit hídrico;

DPV – Déficit de pressão de vapor;

DRE - *Dehydration responsive element* - elemento responsivo à desidratação;

DREB - *Dehydration responsive element binding protein* – proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação;

DREB2A - *Dehydration responsive element binding protein 2A*– proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação 2A;

*DREB2A CA* - *Constitutive active form of DREB2A CA* – forma ativa constitutiva do gene *DREB2A*;

DRIP - *DREB2A-interacting protein* - Proteínas que interagem com *DREB2A*;

DS - Déficit hídrico severo;

DM100S - *Dry matter of 100 seeds* – matéria seca de 100 sementes;

D2A – Plants of *Rd29A:AtDREB2A CA* line – plantas da linhagem *Rd29A:AtDREB2A CA*;

ERD14 - *Early responsive to dehydration 14* – responsivo a desidratação inicial 14;

ERF - *Ethylene-responsive element-binding factors* – Fator de ligação ao elemento responsivos ao etileno;

EUA - Eficiência do uso de água;

FATS - Fração de água transpirável no solo;

FC - *Field capacity* – capacidade de campo;

FC - *Fold-change*;

FT – Fator de transcrição;

FTSW – *Fraction of transpirable soil water* – fração de água transpirável no solo;

GM - *Genetically modified* – geneticamente modificada;

*GmERD1-like* - *Early responsive to dehydration 1 of soybean* – gene responsivo a desidratção inicial 1 de soja;

*GmRD20A-like* - *Responsive desiccation 20A of soybean* – gene responsivo a desidratção 20A de soja;

*GmRD22-like* - *Responsive desiccation 22 of soybean* - gene responsivo a desidratção 22 de soja;

GO – *Gene ontology*;

$g_s$  - *Stomatal conductance* – condutância estomática;

GUS –  $\beta$ -glucoronidase;

H – *Height* – altura;

HASTY – Proteína que exporta o duplex miRNA metilado para o citoplasma;

HD Zip - *Homeodomain associated leucine zipper proteins* – homeodomínio associado a proteínas zíper de leucina;

HEN1 – Proteína que metila as três pontas do duplex de miRNA;

HSF - *Heat shock factors* – fatores de transcrição de choque térmico;

HSP - *Heat shock protein* – proteína de choque térmico;

HYL1 - Proteína de ligação ao RNA de cadeia dupla;

I – *Irrigated* – irrigado;

IDP - *Intrinsically disordered proteins* - proteína intrinsecamente desordenada;

LEA –*Late embryogenesis abundant* - embriogênese tardia abundante;

LAI - *Leaf-area index* – índice de área foliar;

Lp - Condutância hidráulica da raiz;

LTI – *Low temperature induced* - induzido por baixa temperatura;

MAPK - *Mitogen activated protein kinases* - proteínas quinases mitógeno ativada;

Mat1 – *Maturation associated protein 1* – proteína associada a maturação 1;

Mat9 – *Maturation associated protein 9* - proteína associada a maturação 9;

MBF1 - *Multiprotein bridging factor 1c* – fator multiproteico de ponte 1c;

miRNAs – Micro RNAs;

MYB - *Myeloblastosis oncogene* - oncogene mieloblastose;

MYC - *Myelocytomatosis oncogene* - oncogene mielocimatose;

NAC - *NAM, ATAF1, 2, e CUC2*;

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional para Informação Biotecnológica;

NFY - *Nuclear factor Y* - fator nuclear Y;

NI - *Natural conditions* – condições naturais;

NN - *Number of nodes* – número de nós;

Nos-T - *Nopaline synthase terminator* – terminador nopalina sintase;

NP - *Number of pods* – número de vagens;

NS - *Number of seeds* – número de sementes;

OGM - Organismos geneticamente modificados;

PEG – Polietilenoglicol;

PGMs - Plantas geneticamente modificadas;

PM34 – *Seed maturation protein 34* - proteína de maturação de semente 34;

POD – Peroxidase;

PP2Cs - Proteínas fosfatases 2C;

primiRNA – micro RNA primário;

PSI - *Photosystem I* – fotossistema I;

PSII - *Photosystem II* – fotossistema II;

PYR/PYL/RCAR - *Pyrabactin resistant/Pyrabactin resistant-Like/Regulatory Component of ABA Receptor* – resistente a pirabactina/resistente-like a pirabactina/componente regulatório do receptor de ABA;

P5CDH – Gene codificador da D1-pirrolina-5-carboxilato desidrogen;

R- Reverso;

RD - *Responsive dehydration* - responsivo a desidratação;

RD17 - *Responsive dehydration 17* – responsivo a desidratação 17;

RD29A - *Responsive dehydration 29A* – responsivo a desidratação 29A;

RFOs - *Raffinose family oligosaccharides* – oligossacarídeos da família das rafinoses;

RFP1 - *RING-finger protein 1* - proteína em forma de RING-finger 1

RGR - *Relative growth rate* – taxa de crescimento relativo;

RG% - Porcentagem da redução de crescimento;

RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA;

RNAms-alvos – RNAs mensageiros alvos;

RNAsi - Pequenos RNAs que surgem a partir de pares de transcritos senso-antisense;

RNAsi-nat - Transcrito natural antisense, derivado da região de sobreposição do par senso e anti-senso;

ROS - *Reactive oxygen species* - espécies reativas de oxigênio;

RR - *Roundup Ready*;

RS – *Water stress in the reproductive stage* – plantas sob deficit hídrico no estágio reprodutivo.

RWC - *Relative water content* – teor relativo de água;

SDW - *Shoot dry matter* – matéria seca da parte aérea;

SFW – *Shoot fresh matter* - matéria fresca da parte aérea;

siRNAs - *Small interference RNA* - pequenos RNAs de interferência;

SLAC1 - Canal aniônico lento tipo S;

SLN – Sinal de localização nuclear;

SnRK2s - Proteínas quinases Snf1-relatadas 2s;

SOD - Superóxido dismutase;

SRO5 – Similar ao RCD;

TC – Temperatura da copa;

VPD - Vapor-pressure deficit – déficit de pressão de vapor;

VS – *Water stress in the vegetative growth stage* - plantas sob deficit hídrico no estágio vegetativo;

WUE – *Water use efficiency* – eficiência do uso de água;

W1 - *Initial dry plant biomass* – biomassa inicial de plantas secas;

W2 - *Final dry plant biomass* - biomassa final de plantas secas

W2 – Dois dias de déficit hídrico;

W6 – Seis dias de déficit hídrico;

$\psi P$  – *Water potential* – Potencial hídrico.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
3.1	SOJA .....	27
3.2	ESTRESSES ABIÓTICOS COM ÊNFASE NO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE POR CALOR .....	28
3.2.1	PERCEPÇÃO E RESPOSTA INICIAL DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO E AO ESTRESSE POR CALOR .....	29
3.2.1.1	Transcrição gênica em condições de déficit hídrico .....	37
3.2.1.2	Transcrição gênica em condições de alta temperatura .....	37
3.2.1.3	Respostas bioquímicas e metabólicas .....	38
3.2.1.4	Respostas fisiológicas das plantas sob déficit hídrico e estresse por alta temperatura .....	40
3.2.1.4.1	<i>Comportamento do sistema radicular</i> .....	40
3.2.1.4.2	<i>Fixação biológica de nitrogênio</i> .....	42
3.2.1.4.3	<i>Trocas gasosas</i> .....	42
3.2.1.5	Mecanismos de resposta à seca .....	46
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
	<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>83</b>
<b>5</b>	Phenotyping two Brazilian soybean cultivars contrasting in drought response as well as a transgenic line overexpressing <i>AtDREB2A</i> <i>CA</i> <sup>1</sup> .....	<b>77</b>
5.1	ABSTRACT .....	77
5.2	INTRODUCTION .....	78
5.3	MATERIALS AND METHODS .....	79
5.3.1	Plant material .....	79

5.3.2	Experiment to induce water deficit.....	81
5.3.3	Analysis of growth .....	81
5.3.4	Gas exchanges .....	81
5.3.5	Water and osmotic potentials, electrolyte leakage, relative water content and leaf succulence .....	81
5.3.6	Analysis of agronomic characteristics in field conditions .....	82
5.3.7	Experimental design and statistical analysis .....	82
5.4	SUPPLEMENTAL DATA .....	83
5.5	RESULTS .....	83
5.5.1	Experiment in greenhouse.....	83
5.5.2	Experiment in field conditions.....	91
5.6	DISCUSSION .....	94
5.6.1	Experiment in greenhouse.....	94
5.6.2	Experiment in field conditions.....	98
5.7	CONCLUSION .....	100
5.8	ACKNOWLEDGMENTS .....	100
5.9	LITERATURE CITED .....	101
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	106
6	Análise <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de promotores induzidos em cultivar de soja tolerante à seca .....	106
6.1	RESUMO.....	106
6.2	INTRODUÇÃO .....	107
6.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	109
6.3.1	Cultivo do material vegetal e aplicação do tratamento experimental.....	109
6.3.2	Extração de RNA total e microarranjos de DNA.....	109
6.3.3	Análise da expressão gênica.....	110
6.3.4	Análise de RT-qPCR para validação da expressão gênica .....	111
6.3.5	Seleção e análise de promotores induzidos .....	111
6.3.6	Clonagem gênica e construção dos plasmídeos .....	112
6.3.7	Ensaio de expressão transiente em protoplastos de mesofilo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	112

6.4	RESULTADOS .....	113
6.4.1	Identificação de genes responsivos à seca .....	113
6.4.2	Análise de transcritos diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico moderado e severo via RT-qPCR.....	115
6.4.3	Construção de plasmídeo com promotor induzido por déficit hídrico: gene repórter GUS e ensaio de expressão transiente.....	117
6.4.4	Análise pelo Genevestigator.....	120
6.5	DISCUSSÃO .....	126
6.6	CONCLUSÕES .....	130
6.7	REFERÊNCIAS .....	131
	<b>CAPÍTULO III</b> .....	148
7	Identificação de marcadores moleculares de expressão em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico e à alta temperatura .....	148
7.1	RESUMO.....	148
7.2	INTRODUÇÃO .....	149
7.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	151
7.3.1	Cultivo das plantas e tratamento experimental.....	151
7.3.2	Comportamento fisiológico das cultivares BR16 e Embrapa 48 sob déficit hídrico .....	153
7.3.3	Seleção de genes candidatos a serem marcadores de expressão .....	153
7.3.4	Extração do RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo. ....	156
7.4	RESULTADOS .....	156
7.4.1	Resposta fisiológica sob déficit hídrico.....	156
7.4.2	Análise de expressão de genes induzidos sob déficit hídrico e alta temperatura e seus efeitos isolados e combinados.....	159
7.4.3	Identificação de marcadores moleculares de expressão.....	165
7.5	DISCUSSÃO .....	167
7.6	CONCLUSÕES .....	174
7.7	REFERÊNCIAS.....	176
8	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	181

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira movimenta bilhões em moeda nacional anualmente. Dentre as grandes *commodities* brasileiras, a soja é uma das culturas que possui grande destaque e gera muitas divisas a partir da exportação e dos subprodutos gerados. Com um grão rico em óleo e proteína, seu processamento é aplicado tanto na alimentação humana e animal quanto na indústria (MALEK et al., 2012). As maiores quedas de produção brasileira de soja, nos últimos anos, ocorreram devido à estiagem, como pôde ser observado pelas perdas de 8,94 milhões de toneladas de soja na safra 2011/2012 (CONAB, 2014). O potencial de produtividade da cultura foi evidenciado na safra 2012/2013, na qual o desenvolvimento das plantas ocorreu sob ótimas condições climáticas e a produção brasileira alcançou o recorde de 81.456 milhões de toneladas, um incremento de 22,7% comparado à safra anterior (CONAB, 2014).

Uma forma de manter a alta produtividade da soja em condições de déficit hídrico é utilizar cultivares que sejam mais tolerantes à seca. Tais cultivares podem ser obtidas por meio de melhoramento clássico ou por biotecnologia. Países como a China utilizaram essa técnica e observaram um aumento da produtividade em até 79% (JIN et al., 2010). Assim, linhagens com *background* genético para tolerância à seca têm sido utilizadas em diversos estudos, como no caso da cultivar brasileira Embrapa 48, obtida pelo melhoramento clássico (EMBRAPA SOJA, 2010) e plantas *RD29:DREB2A CA* obtidas através da técnica de engenharia genética (ENGELS et al., 2013).

As plantas possuem devido à origem genética clássica respostas diferenciadas ao déficit hídrico - evitamento, escape e tolerância à seca (TURNER et al., 2001). Desta forma, torna-se importante o estudo de fenotipagem e caracterização de plantas mais tolerantes à seca. Assim, alguns estudos com enfoque fisiológico (KHOLOVÁ et al., 2010a, b) têm considerado o melhor uso efetivo de água e, assim, caracterizado plantas que possuem menores taxas de transpiração, além de outras características associadas ao melhor uso efetivo de água, como o aprofundamento de raízes, emissão rápida de raízes novas e aumento da proporção de tecidos condutores, os quais têm sido consideradas mecanismo de evitamento à seca.

Para que as plantas respondam ao déficit hídrico, diversos genes

são diferencialmente expressos. Esses genes possuem nas suas regiões promotoras alguns *cis*-elementos de resposta à desidratação e ao calor. No déficit hídrico existe uma cascata de transdução de sinais dependente de ácido abscísico (ABA) e outra independente de ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). Nos promotores dos genes pertencentes à cascata dependente de ABA existem diversos *cis*-elementos, como o ABRE (CHOI et al., 2000; UNO et al., 2000), sítios de reconhecimento de MYC (ABE et al., 1997), MYB (URAO et al., 1993) e NAC (TRAN et al., 2004) e na cascata dependente de ABA o *cis*-elemento DRE (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). O estudo destes *cis*-elementos também pode indicar a interligação das rotas transcricionais regulatórias, uma vez que as regiões de *cis*-elementos são específicas para cada fator de transcrição (FT) e a ligação desses FTs nas regiões promotoras permite que haja a transcrição do respectivo gene (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). Desta forma, a engenharia genética utiliza diferentes promotores para estudos de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico, como o promotor 35S utilizado para a análise de expressão constitutiva (SAKUMA et al., 2006a; VALENTE et al., 2009) ou o promotor estresse-induzido RD29A (SAKUMA et al., 2006a; ENGELS et al., 2013). A utilização de promotores estresse-induzidos se torna uma ferramenta importante, pois a expressão constitutiva de um gene pode acumular um produto ou subproduto transgênico e causar desenvolvimento anormal ou retardo de crescimento (YI et al., 2010).

O déficit hídrico também tem sido estudado por meio de análises moleculares. Cultivares com *background* para a tolerância à seca tem sido aplicadas em estudos de prospecção gênica para a detecção de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico e à alta temperatura (NEVES-BORGES et al., 2012, RODRIGUES et al., 2012, DEGENKOLBE et al., 2013). Para entender o comportamento transcricional das plantas nestas condições é importante o uso e desenvolvimento de ferramentas de seleção, como os marcadores de expressão e moleculares para déficit hídrico identificados em milho (BADICEAN et al., 2011), grão de bico (VARSHNEY et al., 2009) e soja (NEVES-BORGES et al., 2012). Já marcadores de expressão e moleculares de estresse por alta temperatura foram identificados em trigo (AL-DOSS et al., 2011) e arroz (YE et al., 2012).

Desta forma, para a utilização de cultivares de soja em regiões com

padrões diferentes de déficit hídrico é necessária a identificação do mecanismo de resposta das cultivares de soja e estudos a campo que indiquem o rendimento das cultivares nas respectivas condições. Outra forma de identificar cultivares que tenham melhores resultados à seca é pela utilização de marcadores de expressão por serem capazes de detectar cultivares mais tolerantes à seca e/ou alta temperatura em condições iniciais dos estresses. Além dessas análises, o estudo dos componentes regulatórios também é fundamental no uso da biotecnologia para a compreensão da função de diversos genes e obtenção de plantas geneticamente modificadas que possuam maior tolerância ao déficit hídrico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização fisiológica, agronômica (mecanismo de resposta à seca) e molecular de cultivares de soja convencionais e da linhagem transgênica *AtDREB2A CA*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar mecanismos de respostas à seca em casa-de-vegetação de uma linhagem transgênica *AtDREB2A CA* e das cultivares BR 16 e Embrapa 48 sensível e tolerante à seca, respectivamente;
- 2) Analisar a produtividade em campo das cultivares BR 16 e Embrapa 48 e da linhagem transgênica *AtDREB2A CA* em condições normais de crescimento e sob déficit hídrico aplicado no estágio vegetativo e reprodutivo;
- 3) Analisar os genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico na cultivar Embrapa 48 utilizando a técnica de Microarranjo de cDNA;
- 4) Escolher promotores de resposta ao déficit hídrico a partir de genes expressos na cultivar Embrapa 48 sob déficit hídrico;
- 5) Análisar *in silico* os promotores selecionados quanto à sua expressão em estresses abióticos e bióticos, estádios de desenvolvimento e partes anatômicas pelo GeneVestigator;
- 6) Construir plasmídios contendo os promotores selecionados e análise de expressão transiente sob condições de ABA;
- 7) Análisar a expressão de genes regulatórios e funcionais na resposta ao déficit hídrico e estresse por alta temperatura, aplicados isoladamente e de forma combinada;
- 8) Identificar marcadores de expressão para déficit hídrico e estresse por alta temperatura, aplicados isoladamente e de forma combinada, em folhas, caules e

raízes utilizando como base a cultivar tolerante à seca Embrapa 48;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SOJA

A soja é uma das leguminosas mais importantes economicamente no mundo (HA et al., 2013), possuindo propriedades nutricionais que a tornaram largamente utilizada como fonte de proteína, nutrientes minerais, óleos e produtos naturais, além de conter metabólitos secundários como isoflavonóides (SAKAI & KOGISO 2008), oligossacarídeos, ácido fítico, goitrogens (LIENER, 1994) e fitoestrogênios (OSOSKI & KENNELLY, 2003). É um grão muito utilizado para ração animal e consumo humano (HA et al., 2013), principalmente alimentos como tofu, leite de soja, pasta de feijão fermentado, molho de soja, tempeh entre outros (RAMEDANI et al., 2011). A soja ainda possui propriedades de promoção da saúde como prevenção da diabetes e obesidade e redução do colesterol (HA et al., 2013) além de ter outras aplicações industriais e farmacêuticas (DURANTI, 2006).

Além de novas cultivares convencionais de soja que promoveram aumentos na produtividade brasileira, o uso de variedades transgênicas vem impulsionando nos últimos anos um crescimento significativo na produção deste grão (PONTICELLI et al., 2013). De uma forma geral, este aumento na utilização de soja transgênica no Brasil e no mundo ocorreu principalmente pela inter-relação de alguns fatores como mudanças de gestão (uso de fertilizantes e pesticidas), melhores equipamentos e conhecimento agrônomo e por melhorias genéticas (DUVICK, 2005; BAKER et al., 2012).

Estes fatores genéticos, advindos não apenas de variedades transgênicas mas de melhoramento genético em geral, também favoreceram a produção da soja em outros países, como por exemplo os Estados Unidos da América (EUA) que aumentaram a produtividade de soja em aproximadamente 79% nos estados do norte (WILLIAMS & SEPCHT, 1979; JIN et al., 2010) além de incremento da produção na região centro norte (SEPCHT & WILLIAMS, 1984; JIN et al., 2010) e centro sul (USTUN et al., 2001; JIN et al., 2010). Por sua vez, na principal região produtora de soja da China, região Nordeste, o rendimento médio de soja por hectare aumentou 71,4% em 40 anos (XUE et al., 2006; JIN et al., 2010), de modo que esta região lançou até o final do século passado 600 cultivares (LIU et al.,

2008; JIN et al., 2010).

O reflexo do uso do melhoramento clássico e da biotecnologia na obtenção de organismos geneticamente modificados (OGMs) associados a práticas de manejo adequadas pode ser observado na safra 2012/2013, onde o Brasil, mesmo tendo menor área plantada (27,7 milhões de hectares) em comparação com a área dos EUA (30,8 milhões de hectares) obteve produtividade média da soja superior em 9,7% (EMBRAPA, 2013). Segundo a Conab (2014), a alta produtividade brasileira da última safra e da safra 2009/2010 deveu-se as ótimas condições climáticas, enquanto a safra anterior 2011/2012 foi 8,94 milhões de toneladas inferior à safra anterior. Tais resultados negativos foram causados pela estiagem gerada pela La Niña (CONAB, 2014).

### 3.2 ESTRESSES ABIÓTICOS COM ÊNFASE NO DÉFICIT HÍDRICO E ESTRESSE POR CALOR

A melhoria da produtividade das colheitas das principais culturas de grãos pode ter um limite básico devido a fatores estressantes, como observado pela estabilização dessa melhoria nos últimos anos em 80% do seu potencial de produção teórico (BAKER et al., 2012). Estes fatores estressantes podem ser bióticos ou abióticos e afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas (MANAVALAN et al., 2009). Dentre os fatores abióticos o déficit hídrico é considerado o mais devastador, afetando todas as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas e reduzindo a produtividade da soja (MANAVALAN et al., 2009). A fase mais crítica para o acometimento do déficit hídrico é durante o florescimento ou no período logo após este (MECKEL et al., 1984; MANAVALAN et al., 2009). Ainda, em condições de diminuição de água disponível (escassez) ocorre o encurtamento do período de enchimento de grãos e assim diminuição da transferência dos assimilados para os grãos, o que faz com que haja a redução do peso dos grãos de soja (GHASSEMI-GOLEZANI & FARSHBAF-JAFARI, 2012). O déficit hídrico também pode influenciar as proteínas e o conteúdo do óleo das sementes de soja (GHASSEMI-GOLEZANI & FARSHBAF-JAFARI, 2012).

Muitas vezes o termo “seca” não é definido com base na hidratação do tecido vegetal, mas sim em relação às alterações do solo e às condições meteorológicas (LIPIEC et al., 2013). De fato, o déficit hídrico implica na interação

da atmosfera, sistema de parte aérea e raízes e o solo, todos os elementos conectados como uma série de resistência de transferência onde o fluxo de água ocorre. Assim, o desequilíbrio entre o transporte de água no sistema solo-raiz e o potencial de evapotranspiração gera a seca que normalmente ocorre quando a temperatura do ambiente é alta e a umidade relativa do ar e do solo é baixa (LIPIEC et al., 2013). O déficit hídrico frequentemente acomete as plantas juntamente com o estresse à alta temperatura e os efeitos no rendimento das culturas de ambos os fatores combinados são mais prejudiciais que os efeitos isolados. Principalmente no campo, tais estresses ocorrem simultaneamente, limitando o crescimento e desenvolvimento das plantas, comprometendo conseqüentemente a agricultura sustentável (LIPIEC et al., 2013).

Conforme previsões, no decorrer dos próximos anos, em razão das mudanças climáticas globais, os períodos de seca se tornarão mais severos e frequentes (MANAVALAN et al., 2009). Completando o cenário futuro, aumentos da concentração de CO<sub>2</sub>, eventos de ondas de calor e variações intra e inter-sazonais podem ainda aumentar a complexidade do déficit hídrico e do estresse por alta temperatura (SEKHON et al., 2010; VADEZ et al., 2011; LIPIEC et al., 2013).

Outros fatores abióticos como o estresse salino, temperaturas adversas (frio) e inundações podem também afetar significativamente a produtividade de soja prejudicando o crescimento, a nodulação e outras características agrônômicas (IKEDA et al., 2009; KEERIO et al., 2001; PHANG et al., 2008; SHULTZ et al., 2007; TRAN & MOCHIDA, 2010).

### 3.2.1 Percepção e Resposta Inicial das Plantas ao Déficit Hídrico e ao Estresse por Calor

Para melhorar a produtividade das culturas em condições estressantes ou desfavoráveis, deve-se considerar que as plantas quando expostas a estresses ambientais respondem e se adaptam a níveis molecular, celular, fisiológico e bioquímico (URANO et al., 2010). O primeiro passo nesta adaptação é a percepção do déficit hídrico pelas raízes localizadas nas camadas mais superficiais do solo. A falta de água diminui o potencial hídrico do solo estimulando a síntese do hormônio ácido abscísico (ABA) nesse órgão. A partir das raízes, o ABA é

translocado para as folhas por meio de sinais endógenos que atuam a longas distâncias. Estes sinais seriam químicos (fitormônios e pH), hidráulicos e elétricos (SCHACHTMAN & GOODGER, 2008; PEREZ-ALFOCEA et al., 2011; CHRISTMANN et al., 2013; OSAKABE et al., 2013). Acredita-se ainda que o ABA produzido nos tecidos vasculares das folhas possa afetar o fechamento dos estômatos pelo transporte via difusão passiva e por transportadores de ABA, particularmente por membros da subfamília ABC G (ATP- binding cassette) e assim juntamente com ânions e cátions ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ) induzir a redução do turgor e o volume das células-guarda, promovendo o fechamento estomático (MACROBBIE, 1998; HU et al., 2010; OSAKABE et al., 2013), que, diminui as trocas gasosas e resulta na redução da atividade fotossintética.

Além do fechamento estomático, o aumento de ABA endógeno também induz a expressão de genes de resposta a estresses (HIRAYAMA & SHINOZAKI, 2007; OSAKABE et al., 2013). Esta indução acontece primeiramente porque transportadores localizados na membrana plasmática realizam o transporte intracelular do ABA (BOURSIAC et al., 2013) para o citosol, no qual o ABA induz uma variedade de eventos moleculares (CUTLER et al., 2010; HUBBARD et al., 2010; WEINER et al., 2010; COELLO et al., 2011, 2012). Isto ocorre porque há um complexo receptor de ABA composto de proteínas fosfatases 2C (PP2Cs), proteínas quinases Snf1-relatadas 2s (SnRK2s) e uma família de receptor de ABA (PYR/PYL/RCAR\_ *pyrabactin resistant/pyrabactin resistant-like/regulatory component of ABA receptor*). Quando a célula está sob déficit hídrico, o ABA se liga aos seus receptores (PYR/PYL/RCAR) e os ativam, promovendo a inativação de PP2Cs e permitindo que as SnRK2s fosforilem as proteínas alvo, como o canal aniônico lento tipo S, SLAC1, que controla a resposta estomática (GEIGER et al., 2009; LEE et al., 2009; HUBBARD et al., 2010; LEE & LUAN, 2012) e os fatores de transcrição (FTs) zíper de leucina (bZIP) como os membros ABF/AREB/ABI5 (ABRE- binding factors/ ABRE-binding/ABA insensitive 5) (FUJII et al., 2007; FURIHATA et al., 2006; JOHNSON et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2005) envolvidos na ativação da expressão de genes *downstream* da cascata do ABA tais como o *rd29A* (*responsive dehydration 29A*) entre outros (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006; CUTLER et al., 2010, OSAKABE et al., 2013).

Um dos membros da família bZIP, os AREBs (ABRE-binding factors)

reconhecem as sequências regulatórias mais comuns induzidas por ABA que são os “G-box” elementos de resposta ao ABA (*ABREs- ABA Response Elements*) (CUTLER et al., 2010). Esses elementos são encontrados nas regiões promotoras de diversos genes que estão na cascata ABA-dependente de resposta à seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006) e são os principais *cis*-elementos na cascata de transcrição dependente de ABA (HUANG et al., 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, diversos membros de fatores de transcrição se ligam a essa região. Tais membros são denominados de AREB1, AREB2 e ABF3 (YOSHIDA et al., 2010).

Esses FTs, membros da subfamília A das proteínas bZIP, também foram identificados em soja e sua similaridade entre as espécies indica que os genes diferencialmente expressos, abaixo de sua cascata, em condições de déficit hídrico são similares (MARUYAMA et al., 2012). Segundo Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki (2013) genes codificantes de proteínas LEA, do grupo A das PP2C e vários tipos de FTs são alguns dos genes encontrados nessa cascata em condições de estresse osmótico (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013). Outro membro da mesma subfamília A das proteínas bZIP, juntamente com as proteínas AREB3, AtbZIP67/AtDPB e EEL, também regulam a expressão de proteínas da classe LEA durante condições de estresse (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2013). Em relação a esses membros, para que a expressão de genes ABA-responsivos seja ativada, normalmente são necessárias mais de uma sequência ABRE ou um ABRE e outras sequências como CEs (*Coupling Elements*) na região promotora de genes CUTLER et al. (2010).

Além dos ABREs encontra-se outros *cis*-elementos em promotores de genes responsivos ao ABA como MYC (*myelocytomatosis oncogene*) e MYB (*myeloblastosis oncogenese*). Esses dois sítios de reconhecimento foram identificados no promotor do gene *RD22* considerado responsivo ao ABA (ABE et al., 2003), no entanto *motifs* ABRE-like não foram encontrados (ABE et al., 1997). Além disso, a expressão deste gene foi detectada em condições de resposta tardia ao déficit hídrico, ativada pelo acúmulo de ABA endógeno (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006).

Em *A. thaliana*, o elementos regulatório *AtMYC2* além de ser um fator de transcrição responsivo ao ABA também foi identificado como responsivo ao

ácido jasmônico (BOTER et al., 2004) e ainda na rota de sinalização de luz (YADAV et al., 2005). Na resposta ao ácido jasmônico (AJ), este fator de transcrição também denominado de JIN é um regulador positivo. O ácido jasmônico e etileno atuam em conjunto, o fator JIN é responsável pela repressão de genes (ANDERSON et al., 2004; PIETERSE et al., 2009). Além disso, na via metabólica do ácido salicílico (AS) (LAURIE-BERRY et al., 2006), além de ser regulador central, JIN atua em resposta à estresses bióticos, em vias convergentes de sinalização controladas por ABA, indicando que em certas situações a resistência ao patógeno pode ser reforçada por um estresse abiótico (ATKINSON & URWIN, 2012).

Outros genes da cascata dependente são os genes MYB, que constituem um dos maiores grupos de fatores de transcrição das plantas (DU et al., 2012). Este grupo é altamente conservado nas espécies, atuando nas rotas de estresses bióticos e abióticos, particularmente na regulação da rota de biossíntese de fenilpropanóides (DUBOS et al., 2010). Além disso, a atividade desses fatores de transcrição pode ser controlada pelo estado redox da célula, fato observado pelos resíduos conservados de cisteína presentes nessa família (DUBOS et al., 2010). Desta forma, a S-nitrosilação ou oxidação de resíduos de leucina evitaria a ligação desses FTs ao DNA pela alteração de seu domínio, resultando em um mecanismo de controle nos estresses bióticos e abióticos, além da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HEINE et al., 2004; ATKINSON & URWIN, 2012).

Os FT MYBs, MYB12 e MYB14 são antagonistas na via de biossíntese de flavonóides (SCHENKE et al., 2011). Em condições de estresse por UV-B, por exemplo, ocorre a produção de flavonóides regulados por MYB12, enquanto que, a repressão desse processo ocorre na presença do eliciador bacteriano flg22, o que permite a produção de lenhina e fitoalexinas e outros compostos de defesa. O MYB96, dependente de ABA, promove a tolerância ao déficit hídrico (SEO et al., 2011), induzindo também a biossíntese de cera cuticular durante a desidratação. MYB96 é ainda a ligação entre os hormônios ABA e SA no controle da tolerância aos estresses, já que é necessário a sua presença para que haja resistência contra patógenos (SEO & PARK, 2010). Segundo Seo et al. (2009), esse fator de transcrição integra também os sinais de ABA e auxina e por isso propuseram sua função como uma ligação molecular.

Um elemento regulatório encontrado na cascata de expressão

gênica dependente de ABA é o NAC (NAM, ATAF1, 2, e CUC2), inicialmente encontrado no gene *RD26* que codifica uma proteína NAC (FUJITA et al., 2004). Este gene pode regular genes de desintoxicação de ROS sendo induzido por AJ, patógenos, ABA, seca e salinidade (FUJITA et al., 2004). Em arroz, o OSNAC6 é ativado em condições de estresses bióticos e abióticos e sua superexpressão conferiu às plantas transgênicas tolerância à desidratação e à alta salinidade (NAKASHIMA et al., 2007).

Outra proteína da cascata dependente de ABA é a NFYA5 (*Nuclear Factor Y*, Fator Nuclear Y). Seu *cis*-elemento CCAAT está presente em 25 dos genes eucarióticos e possui alta afinidade e especificidade (LI et al., 2008). Esse fator nuclear é um complexo heterotrimérico composto de NFYA (CBF-B ou HAP2), NFYB (CBF-A ou HAP3) e NFYC (CBF-C ou HAP5) onde NFYA e C contêm como subunidades importantes para a ativação da transcrição domínios ricos em resíduos glutaminas hidrofóbicos (MANTOVANI, 1999). Em *A. thaliana* esse FT é composto por uma família de 10 genes codificadores de NFYA, 13 de NFYB e 13 de NFYC (GUSMAROLI et al., 2002). O *NFYB1* foi superexpresso em *A. thaliana* e milho resultando em plantas com significativas melhorias na tolerância à seca e no rendimento sob déficit hídrico (NELSON et al., 2007). NFY5 também foi fortemente induzido por tratamentos de ABA, confirmando sua importância no controle da abertura estomática e concomitantemente na tolerância à seca (LI et al., 2008). Outro regulador que realiza a modulação do fechamento estomático mediado pelo ABA é o OCP3, membro da família de FTs homeobox (RAMÍREZ et al., 2009). Em *A. thaliana*, este FT também funciona como regulador negativo em resposta à resistência a doenças causadas por fungos patogênicos necrotróficos (COEGO et al., 2005).

Existem outros elementos regulatórios nessa cascata dependente de ABA como fatores de transcrição contendo o homeodomínio ATHB6 que interage com ABI1 atuando como seu regulador negativo (HIMMELBACH et al., 2002) e o GCC-box que reprime a expressão de genes induzidos por ABA (SONG et al., 2005). Como repressores e ativadores nessa cascata atuam, respectivamente, ainda os DBF1 e DBF2 (*DNA-binding proteins*), encontrados, por exemplo, regulando a expressão do gene *rab17* (KIZIS & PAGES, 2002).

A proteína regulatória RFP1 (RING-finger protein 1) em pimenta

(HONG et al., 2007; ASSELBERGH et al., 2008) também é responsiva ao ABA e confere tolerância osmótica. Em soja, a expressão de um gene que codifica uma proteína similar à RFP1, o gene *GmRFP1* (*Glycine max* RING-finger protein 1), cuja função está relacionada com a via de degradação e ubiquitinação de proteínas alvo, apresenta evidências de ser regulada por ABA e induzida por estresse salino (DU et al., 2010). Outras proteínas regulatórias são os FTs WRKY, os quais estão envolvidos nas respostas aos estresses, como observado para o WRKY82 e WRKY45, que são responsivos a estresses bióticos e abióticos em arroz (QIU & YU, 2009; PENG et al., 2011). Os membros dessa família, *GmWRKY54* e *GmWRKY13*, em soja, também atuam na tolerância à seca e salinidade, como reguladores positivos e negativos (ZHOU et al., 2008).

Como diversos genes induzidos pela desidratação não estão presentes na cascata dependente de ABA, sugeriu-se a existência de uma cascata de ativação gênica independente deste hormônio (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). A maior classe de fatores de transcrição dessa via são os fatores de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding* protein) que se ligam à sequência DRE (*Dehydration Responsive Element*) também denominada CRT (*C-Repeat e Low-Temperature-Responsive*) encontrada na região promotora de genes responsivos à desidratação, salinidade, frio e calor, promovendo a transcrição desses genes (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006).

As proteínas DREB fazem parte da família de fatores de transcrição ERF (*Ethylene-Responsive Element-Binding Factors*) e, dentro desse grupo, da subfamília EREBP, que contém uma cópia da sequência de DNA conservada AP2 (KHAN, 2011). Em *A. thaliana*, a família de fatores de transcrição DREB/CBF (*C-repeat Binding Factor*) é classificada em dois grandes grupos DREB1 e DREB2. O grupo gênico DREB1 se localiza no cromossomo quatro (SHINWARI et al., 1998) e compreende os genes que transcrevem os fatores de transcrição DREB1A, DREB1B, DREB1C altamente responsivos a baixa temperatura (LIU et al., 1998; GILMOUR et al., 1998; SHINWARI et al., 1998) e moderadamente à desidratação (GILMOUR et al., 1998). Segundo SAKUMA et al. (2002) o fator de transcrição DREB1A também foi fracamente induzido por alta salinidade. Já o gene *DREB1D/CBF4* foi induzido por desidratação (HAAKE et al., 2002) e fracamente por salinidade e *DREB1E* e *DREB1F* induzidos por alta salinidade (SAKUMA et al.,

2002).

A inserção do FT *AtDREB1A* induziu a expressão de genes de resposta à seca em *A. thaliana* (LIU et al., 1998). Esse gene foi inserido, via transformação genética em diversas culturas economicamente importantes como tabaco (KASUGA et al., 2004), arroz (OH et al., 2005; ITO et al., 2006), milho (QIN et al., 2004), trigo (GAO et al., 2009) amendoim (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007; DEVI et al., 2011) e soja (POLIZEL et al., 2011). A super expressão de *DREB1B* em batata resultou em um aumento significativo da tolerância ao congelamento e seca, com aumento no teor de prolina e teor relativo de água superior sob condições de congelamento e estresse hídrico (MOVAHEDI et al., 2012). Experimentos realizados em casa-de-vegetação em plantas de soja geneticamente modificada (GM) contendo o gene *AtDREB1A* controlado pelo promotor estresse induzido *rd29A* demonstraram que as plantas apresentaram maior condutância estomática, taxa fotossintética e transpiratória quando comparadas a plantas controle não transgênicas, sugerindo a ativação de mecanismos que podem levar à maior tolerância ao déficit hídrico (POLIZEL et al., 2011). Linhagens de soja contendo essa mesma construção foram avaliadas tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo e alguns componentes de produção foram maiores quando a seca foi imposta durante a fase vegetativa (ROLLA et al., 2013).

Além do gene *DREB1A*, outro fator de transcrição da família DREB, o gene *DREB2A* vem sendo utilizado na obtenção de plantas mais tolerantes à seca, salinidade e calor (SAKUMA et al., 2006a, 2006b; QIN et al., 2007; CHEN et al., 2007). Em *A. thaliana*, os homólogos *DREB2A* e *DREB2B* localizam-se no cromossomo seis e são ativados em resposta à seca e salinidade. No entanto, há relatos nos quais *DREB2A* pode induzir a expressão de vários genes de resposta ao calor, estresse ao qual *DREB1A* não confere tolerância. Trabalhos utilizando *DREB2A CA* (forma constitutiva do gene *DREB2A* de *A. thaliana*), sob o controle do promotor constitutivo 35S e estresse-induzido *rd29A* (SAKUMA et al., 2006a, 2006b; SCHRAMM et al., 2008), e também estudos com genes homólogos de *DREB2A* em milho (QIN et al., 2007) e soja (CHEN et al., 2007), indicaram tolerância aumentada ao déficit hídrico, alta temperatura e salinidade em plantas transgênicas quando comparadas à plantas não transformadas, sugerindo que *DREB2A* pode promover a indução da expressão de genes *downstream* de resposta à estes estresses abióticos

em diferentes espécies vegetais.

A forma ativa constitutiva (CA) do gene *DREB2A* foi obtida por SAKUMA et al. (2006a) através de transativação utilizando protoplastos. Os mesmos autores identificaram o domínio de ativação transcricional de *DREB2A* entre os aminoácidos 254 e a região C-terminal, um domínio regulatório negativo entre os aminoácidos 136 e 165 e dois sinais de localização nuclear (SLN) na região N-terminal. Particularmente, o domínio regulatório negativo, localizado adjacente ao domínio de ligação de DNA ERF/AP2, era composto de uma região com aproximadamente 30 aminoácidos, rica em serina e treonina (SAKUMA et al., 2006a). Entre as construções estudadas por esses pesquisadores, a construção sem o seu domínio regulatório negativo deletado foi a que apresentou maior estabilidade no núcleo, expressão do transgene e interação do mesmo na região DRE dos promotores de genes alvos de resposta à seca e ao calor e esse gene passou a ser chamado de *AtDREB2A CA*.

A análise da expressão gênica de plantas de *A. thaliana* contendo o transgene *DREB2A CA* realizada por SAKUMA et al. (2006a) indicou 12 genes *up*-regulados em condições de seca e nove genes *up*-regulados em condições de salinidade e calor. SCHRAMM et al. (2008) corroboraram esses dados de expressão do *DREB2A* em condições de calor, observando que dentre os 21 membros de fatores de transcrição responsivos ao calor apenas HsfA3 é regulado por *DREB2A* em *A. thaliana*. O silenciamento deste em *A. thaliana* diminuiu de 40 a 60% da termotolerância das linhagens silenciadas. Quanto ao mecanismo de atuação, o fator de transcrição interage em cooperação com o HsfA2 e ambos atuam no fator de transcrição HSF1. Este por fim, se liga à região promotora dos genes que transcrevem as proteínas de choque térmico. Desta forma, esse mecanismo aumenta a termotolerância precoce das plantas expostas ao estresse por alta temperatura. Já na fase tardia da termotolerância, o HsfA3 forma hetero oligômeros com Hsfs A1a, A1b e A2 possivelmente com um papel na estabilização da termotolerância. Por meio da análise funcional dos 21 Hsfs de *A. thaliana*, KOTAK et al. (2007) sugeriram que esses fatores de transcrição possuem funções integradas com outros fatores formando complexas rotas metabólicas essenciais e desta forma, ativando diferentes rotas de sinalização de respostas a estresses bióticos e abióticos para que as plantas suportem mais rapidamente mudanças ambientais resultantes

dos estresses.

Em soja, linhagens GMs contendo a construção gênica *rd29A:AtDREB2A* CA foram obtidas com poucas (linhagem P1397) e várias cópias (linhagem P2193) inseridas (ENGELS et al., 2013). Ambas as linhagens apresentaram expressão diferencial do transgene na geração T<sub>1</sub> e T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, respectivamente, sendo a P2193 considerada mais estável. Após serem submetidas à desidratação, as plantas mostraram altos níveis de expressão no tecido radicular, com redução da taxa fotossintética (*A*) e condutância estomática (*gs*) após 30 min de tratamento (ENGELS et al., 2013).

Liu et al. (1998) analisaram a superexpressão de *DREB2A* sob o controle de um promotor constitutivo em experimentos de retardo de crescimento e detectaram poucas mudanças no fenótipo das plantas e no RNAm do transgene mesmo em condições normais de desenvolvimento, além da ausência do RNAm do gene *RD29A*, um dos genes presentes na cascata, sugerindo que a proteína *DREB2A* necessitaria de modificações como fosforilação para exercer sua função na resposta à desidratação.

O processo de proteólise do fator de transcrição *DREB2A* foi estudado por Qin et al. (2008) em *A. thaliana*, uma vez que esta planta-modelo acumula esse FT em níveis basais sob condições normais de desenvolvimento. Esses autores sugeriram duas proteínas denominadas DRIP1 e DRIP2 (*DREB2A-Interacting Protein* Proteínas) que possuem o domínio C3HC4 RING como responsáveis por mediar a proteólise do *DREB2A* no proteosoma 26S. Estas proteínas funcionam como uma ubiquitina E3 e atuam no núcleo, em condições de expressão basal ou vazamento do gene *DREB2A*. A hipótese sugerida pelos autores é que em condições de estresse a degradação da proteína *DREB2A* pode ser bloqueada ou inibida pela competição de um sinal de estresse dependente de modificação e assim a célula vegetal teria quantidade suficiente dessa proteína necessária para ativar a expressão dos genes da sua cascata.

Quanto à estabilidade do fator de transcrição *DREB2A*, Morimoto et al. (2013) detectaram que a proteína é mais estável no citosol do que no núcleo. No entanto, a condição estável da proteína *DREB2A* foi dependente dos níveis de transcrição e das condições de estresse, como observado em linhagens transgênicas que expressaram o gene *DREB2A* constitutivamente e apresentaram

níveis baixos de expressão em condições controle e aumento da transcrição em condições de desidratação e estresse por alta temperatura. Os mesmos autores sugeriram que para a ativação da expressão do gene alvo, o FT DREB2A necessita de regulação pós-traducional que envolve basicamente etapas de estabilização e ativação. Essas descobertas sugerem que além da DRIP1 e DRIP devem existir outras proteínas mandatórias para a ativação do gene em condições de estresse (MORIMOTO et al., 2013).

### 3.2.1.1 Transcrição gênica em condições de déficit hídrico

De maneira geral, os genes que possuem expressão diferencial em condições de déficit hídrico e, portanto, regulação transcricional por meio de FTs, e pós transcricionais como RNAi e micro RNAs, são classificados em duas categorias: genes que codificam proteínas funcionais e genes que codificam proteínas regulatórias (SHINOZAKI et al., 2003).

O grupo de proteínas funcionais incluem proteínas que provavelmente atuam não apenas na resposta ao déficit hídrico, mas também na tolerância aos estresses abióticos (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Assim, esse grupo é composto por proteínas como LEA (Late Embryogenesis Abundant), chaperonas, enzimas chave para a biossíntese de osmólitos, osmotina, transportadores de prolina e açúcares, proteínas ligantes ao RNAm, enzimas de desintoxificação, proteínas de anti-congelamento e várias proteases (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Já o grupo de proteínas regulatórias é composto por vários fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras (como proteínas de ligação, a calmodulina), fosfatases, quinases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, ou seja, proteínas reguladoras e fatores protéicos envolvidos na regulamentação adicional de transdução de sinal (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

### 3.2.1.2 Transcrição gênica em condições de alta temperatura

Em temperatura ambiente extrema, as taxas de reações bioquímicas, a fluidez de membrana, a absorção de água e nutrientes e a

conformação de proteínas e ácidos nucleicos são impactadas (CHINNUSAMY et al., 2007; WINFIELD et al., 2010; CHEW & HALLIDAY, 2011). Assim, para que a planta possa sobreviver em condições de estresse por alta temperatura, ou seja, adquira termotolerância, a planta acumula chaperonas moleculares, as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* – HSP) (KOTAK et al., 2007b). Essas proteínas são transcritas quando FT, os HSFs (*Heat Shock Factors*), se ligam em suas regiões promotoras ativando a transcrição.

Além disso, dentro do estresse por alta temperatura, Schramm et al. (2008) e Chen et al. (2010) analisaram *A. thaliana* transformada com os genes que transcrevem os fatores de transcrição DREB2A e DREB2C e observaram um aumento da tolerância ao estresse por alta temperatura. Segundo esses autores, DREB2A e DREB2C estão envolvidos diretamente na via de resposta ao choque térmico, ativando a transcrição do HSF3 que forma um dímero com outros HSFs e esse complexo DREB2C se liga na região promotora dos HSPs (CHEW & HALLIDAY, 2011). Existem ainda outros reguladores transcricionais que também estão envolvidos na resposta ao estresse por alta temperatura como, por exemplo, o regulon MBF1 (multiprotein bridging factor 1c) presente em *A. thaliana* (SUZUKI et al., 2011).

### 3.2.1.3 Respostas bioquímicas e metabólicas

Quando as plantas estão expostas ao déficit hídrico, neutralizam os efeitos negativos dessa exposição por meio da ativação de respostas bioquímicas que incluem a manutenção da homeostase intracelular de íons, síntese e acúmulo de osmólitos e eliminação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) (GOLLDACK et al., 2011).

Além do déficit hídrico, o estresse por alta temperatura também produz estresse oxidativo nas plantas porque ambos aumentam a produção de ROS (como oxigênios *singlete*), o que consequentemente causa danos como degradação de proteínas, inativação de enzimas e lesões de membranas nas células (ZLATEV & LIDON, 2012; HOWARTH, 2005). Ainda, o estresse por altas temperaturas a curto ou longo prazo (temperaturas mais moderadas) (WAHID et al., 2007) induz nas células a produção de compostos tóxicos que juntamente com ROS são resultados

da desnaturação de proteínas, da inativação de enzimas e podem causar a redução da síntese e degradação das mesmas, o aumento da fluidez da membrana lipídica e de diferentes padrões de integridade de membranas (HOWARTH, 2005; KOZLOWSKA, 2007), a interrupção do transporte de assimilados, a desintegração da grana dos tilacóides, a diminuição no teor de clorofila e o aumento da atividade amilolítica (KOZLOWSKA, 2007). Essas lesões celulares podem reduzir o crescimento da planta e o fluxo de íons (HOWARTH, 2005; LIPIEC et al., 2013).

Para diminuir a toxicidade das espécies reativas de oxigênio produzidas em condições de estresse, as células produzem enzimas antioxidantes como SOD (superóxido dismutase, EC 1.15.1.1), CAT (catalase, EC 1.11.1.6), e POD (peroxidase, EC 1.11.1.7). Outra forma de diminuir essa toxicidade é a aplicação de nutrientes como N (nitrogênio), K (potássio), Ca (cálcio) e Mg (magnésio) que realizam a eliminação das ROS (WARAICH et al., 2012). Moléculas antioxidantes como compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas e lignina também podem ser sintetizadas para minimizar as lesões celulares (WAHID, 2007; ZLATEV & LIDON, 2012).

De modo geral, esses antioxidantes e outros osmólitos compatíveis são produzidos em resposta a uma cascata de sinalização, que ajuda a promover o balanço hídrico e osmótico. A expressão de cascatas de sinalização MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e CDPK (*Calcium Dependent Protein Kinase*) é aumentada pelos efeitos iniciais do estresse térmico, ou seja, pela indução do influxo de  $Ca^{2+}$  e reorganização do citoesqueleto (ASHRAF & HARRIS, 2013; WAHID et al., 2007).

Dentre os osmólitos compatíveis produzidos, a prolina e a glicinabetaína são acumulados e facilitam a absorção de água (HARE & CRESS, 1997; ASHRAF & FOOLAD 2007) em condições de déficit hídrico. Ambas realizam além da proteção contra o aumento das ROS no citossol e vacúolos (pro citossol e vacúolos), o ajuste osmótico protegendo proteínas, DNA e membranas (SMIRNOFF & CUMBES, 1989; MATYSIK et al., 2002).

Durante condições de estresse salino e hídrico, a prolina atenua a super redução do fotossistema I (PSI, do inglês *Photosystem I*), aumentando a disponibilidade de  $NADP^+$ , advindo da redução do glutamato na síntese da prolina, no cloroplasto, e previne perturbação das vias redox-sensíveis (HARE & CRESS,

1997). Além de realizar a eliminação de ROS durante a seca, a prolina também protege o fotossistema II (PSII, do inglês *Photosystem II*), e previne a peroxidação lipídica (MOLINARI et al., 2007). Também atuando na eficiência fotoquímica do PSII está a glicinabetaína, que não elimina diretamente a produção de ROS durante estresses osmóticos (CHEN & MURATA, 2008), mas protege as células contra danos oxidativos (PARK et al., 2007; CHEN & MURATA, 2008). O acúmulo de glicinabetaína é mais eficaz nos cloroplastos, como observado pela sua ação no PSII do que em outros compartimentos celulares (PARK et al., 2007). Além disso, Hoque et al. (2007) demonstraram que ambos aminoácidos prolina e glicinabetaína possuem papéis na regulação de enzimas antioxidantes.

Existem ainda açúcares solúveis que além de contribuírem para a regulação da sinalização do ROS, possuem papel de ajustes osmóticos em condições de estresses abióticos (VINO CUR & ALTMAN 2005; SEKI et al., 2007). Estes açúcares estão envolvidos na proteção e metabolismo das vias de eliminação e produção da ROS como as vias oxidativa pentose-fostato, fotossíntese e respiração mitocondrial (COUÉE et al., 2006). Dentre esses açúcares está a trehalose, um dissacarídeo que entre suas funções está a atuação como molécula sinalizadora do ABA sob condições de estresse (AVONCE et al., 2004). Em plantas transgênicas de arroz expressando a trehalose da *Escherichia coli* sob condições de seca e salinidade, os danos foto-oxidativos em PSII foram menores quando comparados com as plantas não-transformadas (GARG et al., 2002).

Outro açúcar solúvel que atua na regulação e sinalização do ROS sob estresse está o manitol, que protege o aparato cloroplasmático contra danos foto-oxidativos causados por  $\text{HO}^*$  (MILLER et al., 2010), como observado em plantas transgênicas de tabaco, as quais apresentaram maior produção de manitol voltado para o cloroplasto, maior capacidade de eliminação de  $\text{HO}^*$  e a maior resistência das plantas transgênicas ao estresse oxidativo (SHEN et al., 1997a,b).

#### 3.2.1.4 Respostas fisiológicas das plantas sob déficit hídrico e estresse por alta temperatura

##### 3.2.1.4.1 Comportamento do sistema radicular

O déficit hídrico acomete as plantas quando a temperatura do ambiente é alta e a umidade relativa do ar são baixas, combinação esta de condições que afetam a hidratação da planta e do tecido e, portanto, não pode ser definida apenas como um período de tempo seco prejudicial às culturas no qual alterações nas condições do solo e meteorológicas estão ocorrendo (LIPIEC et al., 2013).

O aparecimento do déficit hídrico agrícola ocorre quando, durante a estação de crescimento das culturas, as chuvas são insuficientes para atender a demanda da planta, ou ainda existe uma insuficiência de água no solo (SEKHON et al., 2010; VADEZ et al., 2011, 2012; WAHID et al., 2007). Dessa maneira, o déficit hídrico ocorre devido a um desequilíbrio da taxa de fluxo de água e do potencial de transpiração, como um resultado da disparidade da resistência de transferências de água entre o solo, o sistema de raízes, a parte aérea e a atmosfera (LIPIEC et al., 2013).

Em condições normais o fluxo de água solo-raízes é regulado pela condutância hidráulica da raiz ( $L_p$ ), que depende do gradiente de potencial hídrico entre o solo e as raízes e varia entre os diferentes tipos de raízes, ao longo de seu comprimento, idade, crescimento e plasticidade da raiz (DOUSSAN et al., 1998). A  $L_p$  é modulada pela permeabilidade da membrana celular e por canais de água (aquaporinas), que no início do déficit hídrico de curto prazo pode causar o aumento e posteriormente diminuição de  $L_p$  (LIPIEC et al., 2013). Quando esse déficit hídrico se prolonga ocorre a suberização da endoderme e da exoderme radicular promovendo uma redução maior de  $L_p$  (VANDELEUR & MAYO, 2009). A diminuição de  $L_p$  no déficit hídrico a curto e longo prazo evita que a planta perca água para o solo seco apesar de reduzir o fluxo de água para a planta. Em episódios mais longos de déficit hídrico o valor de  $L_p$  pode ser ainda mais reduzido pela embolia do xilema (LIPIEC et al., 2013).

As condições de déficit hídrico iniciam-se com a interação entre o solo e o sistema de raízes, que com sua arquitetura faz com que haja diminuição da eficiência de absorção devido a aglutinação de raízes (BEUDEZ & DOUSSAN, 2013; TARDIEU et al., 1992), afetando também a heterogeneidade vertical da água disponível no solo (GARRIGUES et al., 2006). Para que a absorção de água continue por mais tempo, o  $L_p$  das raízes (aquaporinas e suberização) modula a

extensão e velocidade desse processo, além de ajudar a aumentar a absorção de água em zonas mais úmidas, compensando a pouca absorção em zonas mais secas (CARMINATI et al., 2009; TAYLOR & WILLART, 1983). Esse aumento da absorção em zonas mais úmidas pode ser modulado também por exsudatos de raízes, mucilagem e possivelmente pelo acúmulo de solutos (CARMINATI & VETTERLEIN, 2013; MCCULLY et al., 2009; READ et al., 2003; STIRZAKER & PASSIOURA, 1996).

Na prolongação do déficit hídrico pode haver o maior crescimento de raízes que estão em contato com as regiões mais úmidas dos solos (HUANG & EISSENSTAT, 2000; SEKHON et al., 2010), porém se a privação de água permanecer pode haver um desacoplamento entre a produção de carbono em folhas e nas raízes, fazendo com que haja uma redução global do crescimento da raiz (MULLER et al., 2011). Outra forma de adaptação das raízes à seca é o crescimento da raiz principal em direção às camadas inferiores do solo em busca de água (TAYLOR et al., 1978; MANAVALAN et al., 2009). Isso indica que a plasticidade das raízes é fundamental para adquirir mais água, como pode ser observado pelo aumento da razão raiz: parte aérea resultado do aumento da partição de biomassa em raízes (MANAVALAN et al., 2009). Pesquisas têm mostrado que o enraizamento profundo pode contribuir para o melhor aproveitamento de água e nutrientes. Rosolem (2005) indicou que a produtividade máxima da soja só é obtida se o sistema radicular atingir até 1 m de profundidade. Caso as raízes atinjam por exemplo apenas 60 cm, a produção de soja alcançará 70% da máxima. Porém, quando esse desenvolvimento radicular profundo é restringido, diminuindo o volume de solo explorado pelas raízes em busca de água e nutrientes o que, em termos práticos, significa que o tamanho do reservatório de água disponível às plantas é substancialmente reduzido.

#### *3.2.1.4.2 Fixação biológica de nitrogênio*

Estudos têm demonstrado que em condições de déficit hídrico a fixação biológica do nitrogênio é reduzida, como observado pela redução da atividade da nitrogenase (70%) durante os quatro primeiros dias de seca (MANAVALAN et al., 2009). Isso ocorre porque a respiração ligada à nitrogenase e

sua atividade, bem como o acúmulo de lipídios oxidados e substratos da respiração, e a ativação de genes antioxidantes, são diminuídos pelo aumento da resistência da difusão do oxigênio para o bacterióide, que tem a atividade respiratória prejudicada (NAYA et al., 2007). Outros fatores como o aumento de ureídios e aminoácidos livres, a diminuição da atividade do nódulo sucrose sintase, a redução no fluxo de carbono para os nódulos e a disponibilidade reduzida de oxigênio também inibem a fixação de nitrogênio nos nódulos de legumes (KING & PURCELL, 2005; ARRESE-IGOR et al., 1999; GONZALEZ et al., 1995; DURAND et al., 1987). Assim, o déficit hídrico afeta diretamente e significativamente a atividade da nodulação (MANAVALAN et al., 2009). Como resultado, a redução de suplemento do nitrogênio para a produção de proteínas faz com que os rendimentos das culturas diminuam, já que a produção de proteína é fator crítico para a produção de sementes (PURCELL & KING, 1996).

#### 3.2.1.4.3 Trocas gasosas

A condutância estomática influencia as trocas gasosas e de vapor d' água (MANAVALAN et al., 2009; KHOLOVÁ et al., 2010) desempenhando papel fundamental na regulação do equilíbrio da água dentro da planta (TUBEROSA, 2012). De maneira geral, a condutância estomática é influenciada por vários fatores, como a arquitetura foliar (TSUDA & TYREE, 2000; SACK et al., 2003) e fatores físicos como a condutância hidráulica (SPERRY et al., 2005), que em curto prazo pode variar dependendo de processos físico-químicos como a cavitação (SALLEO et al., 2001), a alteração da permeabilidade da parede, o colapso da parede (COCHARD et al., 2004) e a alteração da viscosidade da água (ZWIENIECKY et al., 2001; KHOLOVÁ et al., 2010).

Em condições naturais, a planta pode passar de um solo saturado com água a um solo em que haja pouca água disponível e nessa fase de transição ocorre a diminuição da condutância estomática, dependente da espécie e da quantidade de água disponível no solo (MANAVALAN et al., 2009). Em estudo realizado com soja em condições de déficit hídrico moderado, Liu et al. (2003) observaram uma diminuição da condutância estomática concomitantemente a um aumento na quantidade de ABA no xilema, respondendo aos sinais químicos

desencadeados pelo estresse (MANAVALAN et al., 2009). Em condições de déficit hídrico, a perda de água pelos estômatos durante as trocas gasosas é composta pela condutância cuticular (e qualquer condutância residual), já que os estômatos tendem a se fechar nessas condições (MANAVALAN et al., 2009). Em condições normais essa condutância é muito baixa, sendo desprezada em relação à condutância total (MANAVALAN et al., 2009).

É importante destacar ainda que em plantas como soja e principalmente espécies xerófitas a densidade da pubescência foliar é responsável pelo aumento da reflectância da folha e, portanto, pela temperatura mais baixa em condições de alta irradiância (MANAVALAN et al., 2009). Estudos demonstraram que linhagens de soja com pubescência densa apresentaram extensão de raiz mais profunda além de maior densidade radicular e maior vigor vegetativo (GARAY & WILHELM, 1983), restrição da perda de água pela transpiração e aumento da fotossíntese (SPECHT & WILLIAMS, 1985).

Os estômatos são responsáveis pela co-regulação do influxo de CO<sub>2</sub> para a atmosfera e pela perda de água por transpiração (GILBERT et al., 2011). Como grande parte da troca de CO<sub>2</sub> e de água é realizada na folha, os estômatos são um dos principais componentes na eficiência do uso de água (EUA), definido pela quantidade de água utilizada para fixar carbono (GILBERT et al., 2011). Assim, esta é uma medida da eficácia de uma cultura para economizar água, refletindo o quanto a água pode ser convertida em grão (SEKHON et al., 2010; LIPIEC et al., 2013). Quando se necessita calcular o valor da EUA sem a destruição da parte aérea, o qual normalmente é calculado utilizando-se o peso seco da parte aérea, pode-se utilizar o EUA intrínseco, que é definido como a razão da fotossíntese ( $A$ ) pela condutância estomática ( $g_s$ ) (SEIBT et al., 2008). Avaliações realizadas em campo demonstraram variações na taxa de EUA em plantas de soja, resultado que foi relacionado às diferentes bases genéticas das plantas (MIAN et al., 1996). Comumente, altos valores de EUA em condições de seca podem contribuir para manter a produtividade das culturas (MANAVALAN et al., 2009).

Ainda, a fração de água transpirável no solo (do inglês FTSW – *Fraction of Transpirable Soil Water*) onde a transpiração declina é outro parâmetro extremamente útil para compreender e prevenir o comportamento dos genótipos sob déficit hídrico (SINCLAIR & LUDLOW, 1986; SADRAS & MILROY, 1996; RAY &

SINCLAIR, 1997).

Outro ponto importante a ser levado em consideração em relação à transpiração é a área foliar, pois esta determina também a perda de água da planta. Uma boa parte da perda de água realizada pelas folhas é ocasionada pelas trocas gasosas realizadas nos estômatos. Dessa forma, uma baixa condutância estomática, relacionada à diferença da densidade estomática (DE) pode conferir um bom padrão do uso conservativo de água (KHOLOVÁ et al., 2010). Essa densidade estomática é regulada em *A. thaliana* por um único gene chamado de *ERECTA*, descoberto em estudos envolvendo genes de regulação da transpiração (MASLE et al., 2005). O menor índice da perda de água por unidade de área foliar pode ser gerada também por diferenças genotípicas como demonstrado em milho por Kholová et al. (2010b).

A taxa de transpiração também está relacionada com a temperatura da copa (TC), uma vez que a capacidade da regulação dos estômatos para a perda de água na folha é indicada pela diferença entre o ar circundante e a temperatura da copa (ISODA & WANG, 2002; KHOLOVÁ et al., 2010). Essa diferença é medida por imagem térmica e denominada depressão de temperatura do dossel, a qual é resultado dos efeitos de várias características morfofisiológicas e bioquímicas que atuam na copa, folha, estômatos e raízes (Tuberosa, 2012). Assim, o *screening* de plantas que apresentem diferentes taxas de transpiração e sensibilidade da transpiração para o déficit de pressão de vapor (DPV) poderia ser realizado pela medição da TC (GONZALEZ-DUGO et al., 2005; BAHAR et al., 2008; BELKO et al., 2013).

As plantas podem diminuir o consumo de água no solo (vigor inicial), limitando o seu uso durante o crescimento, para poder utilizar essa água reservada principalmente no enchimento dos grãos (KHOLOVÁ et al 2010a; ZAMAN-ALLAH et al., 2011). Outro mecanismo que limita o uso da água nas plantas são as baixas trocas gasosas em condições normais de crescimento e alto DPV como observado em soja onde o DPV >2,0 kPa limita o crescimento de certos genótipos (SINCLAIR et al., 2005; DEVI et al., 2010). Além disso, a menor transpiração em plantas tolerantes em relação as sensíveis à seca pode ser considerado um terceiro mecanismo de limitação (FLETCHER et al., 2007; SADOK & SINCLAIR, 2009; BELKO et al., 2013).

O vigor inicial é importante, pois plantas com essa característica sob

condições de baixa evapotranspiração permitem a otimização da eficiência de uso de água e limitam a perda de água devido à evaporação direta da superfície do solo (TUBEROSA, 2012). Isto significa que mais água pode ficar disponível para os estádios de desenvolvimento posteriores, quando a umidade do solo torna-se menor (SLAFER et al., 2005; RICHARDS, 2006; REBETZKE et al., 2007; RICHARDS et al., 2007). Por outro lado, um excessivo desenvolvimento nos estádios iniciais pode diminuir precocemente a umidade do solo devido a maior perda de água pela parte aérea e maior absorção de água pelas raízes. Deste modo, o grau ótimo do vigor vai depender das características atmosféricas e de solo de cada local.

Particularmente, tanto no déficit hídrico quanto no estresse por alta temperatura, a diminuição do  $\text{CO}_2$  interno reduz a fotossíntese, inibindo a síntese de enzimas fotossintéticas e de ATP (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREC, 2007; ZLATEV & LIDON, 2012). Nos dois estresses a liberação dos íons de cálcio e magnésio das suas ligações, a remoção de proteínas externas e a diminuição do transporte de elétrons suprimem a eficiência fotoquímica do fotossistema II (BARTA et al., 2010; WAHID et al., 2007; ZLATEV & LIDON, 2012). Apesar de o PSII ser mais sensível à alta temperatura, devido ao rompimento de processos metabólicos (disruption) que causa a eliminação do PSII nas membranas dos tilacóides (PRASAD et al., 2008), essa fragilidade é menor quando as plantas passam por déficit hídrico juntamente com o estresse por alta temperatura já que o déficit hídrico nesse caso tem um efeito protetor ao fotossistema (LU & ZHANG, 1999).

O efeito da alta temperatura na capacidade fotossintética é mais danoso às plantas  $\text{C}_3$ , comparado às plantas  $\text{C}_4$ , devido à diferente distribuição de energia e atividades das enzimas do metabolismo de carbono, particularmente da Rubisco (SALVUCCI & CRAFTS-BRANDNER, 2004). Além disso, os efeitos negativos da alta temperatura e do déficit de pressão do vapor na fotossíntese da folha e EUA podem ser parcialmente compensados por um aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférico. Isto pode ser alcançado através da manutenção da concentração ideal de  $\text{CO}_2$  na câmara subestomática a um menor nível de abertura dos estômatos, resultando em menores taxas de transpiração e economia de água (CONDON et al., 2002; VADEZ et al., 2011). No entanto, estas estratégias, podem induzir estresse térmico com aumento da temperatura foliar e redução da condutância estomática e transpiração (KRÓL, 2013).

### 3.2.1.5 Mecanismos de resposta à seca

As plantas em geral utilizam diferentes mecanismos para lidar com a seca, os quais podem ser classificados em três grupos (TURNER et al., 2001): escape, evitamento e tolerância à seca. Plantas que usam como estratégia o escape podem possuir um ciclo de vida mais curto, completando seu ciclo durante o período de água disponível, e produzindo apenas algumas sementes (MANAVALAN et al., 2009). Já as plantas que evitam a seca, utilizam vários mecanismos para manter alto estado hídrico durante os períodos de estresse hídrico, como a redução da evapotranspiração e uma eficiente absorção de água pelas raízes (MANAVALAN et al., 2009). Tais mecanismos incluem ainda características morfo-fisiológicas como o aprofundamento de raízes, o aumento da proporção de tecidos condutores, a emissão rápida de raízes novas, o ajustamento osmótico, o enrolamento foliar, a redução da área foliar, a abscisão foliar, o aumento de tricomas, a deposição de ceras epicuticulares, o florescimento precoce e o enrijecimento da parede celular. Entretanto, à medida que o potencial hídrico do solo decresce e o estresse se intensifica, os mecanismos de tolerância tornam-se críticos para sua sobrevivência (SUNKAR, 2010).

As células tolerantes devem ter a habilidade de regular os processos metabólicos à medida que as células desidratam para reparar os danos (PAMMENTER et al. 2002; WALTERS et al. 2002). Produtos do metabolismo não controlado em particular as ROS têm sido apontados como agentes causais destes danos (LEPRINCE et al., 1990; APEL et al., 2004, MILLER et al., 2010). Além disso, plantas tolerantes podem realizar ainda o acúmulo de protetores moleculares, a remobilização de carboidratos solúveis em água nos caules, entre outros processos (TUBEROSA, 2012).

Segundo Lawlor (2013) existe ainda um quarto mecanismo de resposta à seca: a sobrevivência. Neste caso, os órgãos, tecidos e células das plantas cessam o seu crescimento durante as condições de seca, realizando o chamado estado de quiescência. Após o período de déficit, essas plantas recuperam

rapidamente o seu status hídrico normal e suas funções celulares básicas retornam à normalidade.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABE H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; URAO T.; IWASAKI T.; HOSOKAWA D.; SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell Online**, v. 9, p. 1859–1868, 1997.
- ABE H.; URAO T.; ITO T.; SEKI M.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **The Plant Cell Online**, v. 15, p. 63–78, 2003.
- AL-DOSS A. A.; ELSHAFEI A. A.; MOUSTAFA K. A.; SALEH M.; BARAKAT M. N. Comparative analysis of diversity based on morpho-agronomic traits and molecular markers in durum wheat under heat stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 3671-3681, 2011.
- ANDERSON J. P.; BADRUZSAUFARI E.; SCHENK P. M.; MANNERS J. M.; DESMOND O. J.; EHLERT C.; MACLEAN D. J.; EBERT P. R.; KAZAN K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate–ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, v. 16, p. 3460–3479, 2004.
- ANTHON G. E. & EMERICH D. W. Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 92, p. 346-351, 1990.
- APEL K.; HURT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- APSE M. P. & BLUMWALD E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 146-150, 2002.
- ARASIMOWICZ M. & FLORYSZAK-WIECZOREK J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v. 172, p. 876-887, 2007.
- ARRESE-IGOR C.; GONZALEZ E. M.; GORDON A. J.; MINCHIN F. R.; GALVEZ L.; ROYUELA M.; CABRERIZO P. M.; APARICIO-TEJO P. M. Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. **Symbiosis**, v. 27, p. 189 – 212, 1999.
- ASAKURA T.; TAMURA T.; TERAUCHI K.; NARIKAWA T.; YAGASAKI K.; ISHIMARU Y.; ABE K. Global gene expression profiles in developing soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 147-153, 2012.
- ASGHAR R.; FENTON R. D.; DEMASON D. A.; CLOSE T. J. Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. **Protoplasma**, v. 177, p. 87-94, 1994.

ASHRAF M. & FOOLAD M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206–216, 2007.

ASHRAF M. & HARRIS P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, p. 163-190, 2013.

ASSELBERGH B.; DE VIEESSCHAUWER D.; HOFTE M. Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 709–719, 2008.

ATKINSON N. J. & URWIN P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3543, 2012.

AVONCE N.; LEYMAN B.; MASCORRO-GALLARDO J. O.; VAN DIJCK P.; THEVELEIN J. M.; ITURRIAGA G. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3649–3659, 2004.

BADICEAN D.; SCHOLTEN S. & JACOTA A. Transcriptional profiling of *Zea mays* genotypes with different drought tolerances – new perspectives for gene expression markers selection. **Maydica**, v. 56, p. 1724, 2011.

BAHAR B.; YILDIRIM M.; BARUTCULAR C.; GENÇ I. Effect of canopy temperature depression on grain yield and yield components in bread and durum wheat. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 36, p. 34–37, 2008.

BAKER J. M.; GRIFFIS T. J. & OCHSNER T. E. Coupling landscape water storage and supplemental irrigation to increase productivity and improve environmental stewardship in the U.S. Midwest. **Water Resources Research**, v. 48, p. 1-12, 2012.

BARTA C.; DUNKLE A. M.; WACHTER R. M.; SALVUCCI M. E. Structural changes associated with the acute thermal instability of Rubisco activase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 499, p. 17-25, 2010.

BARRS, H. D. Effect of cycle variations in gas exchange under constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 21, p. 918-929, 1968.

BELIN C.; THOMINE S. & SCHROEDER J. I. Water balance and the regulation of stomatal movements. In *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert and Govindjee (eds). Springer, Netherlands, pp. 283–305, 2010.

BELKO N.; ZAMAN-ALLAH M.; DIOP N. N.; Cisse N.; ZOMBRE G.; EHLERS J. D.; VADEZ V. Restriction of transpiration rate under high vapour pressure deficit and non-limiting water conditions is important for terminal drought tolerance in cowpea. **Plant Biology**, v. 15, p. 304-316, 2013.

BENJAMINI Y. & HOCHBERG Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**

**B**, v. 57, p. 289 -300, 1995.

BERGER S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, p. 407–412, 2007.

BEUDEZ N. & DOUSSAN C. Influence of three root spatial arrangement on soil water flow and uptake. Results from an explicit and an equivalent, upscaled, model. **Procedia Environment Science**, v. 19, p. 37-46, 2013.

BHATNAGAR-MATHUR P.; DEVI M. J.; REDDY D. S.; LAVANYA M.; VADEZ V.; SERRAJ R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHARMA K. K. Stress inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water limiting conditions. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2071–2082, 2007.

BIOINFORMATICS EVOLUTIONARY GENOMICS  
(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

BLUM A. Breeding for Stress Environments. **Boca Raton: CRC Press**, p. 245, 1988.

BLUM A. & EBERCON A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v. 21, p. 3-47, 1981.

BOTER M.; RUIZ-RIVERO O.; ABDEEN A.; PRAT S. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. **Genes Dev**, v. 18, p. 1577–91, 2004.

BOURSIAC Y.; LERAN S.; CORRATGE-FAILLIE C.; GOJON A.; KROUK G.; LACOMBE B. ABA transport and transporters. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 325–333, 2013.

CANTERI M. G.; ALTHAUS R. A.; FILHO J. S. V.; GIGLIOTI E. A.; GODOY C. V. SASM-Agri – Sistema para análise de separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, 2001.

CARMINATI A.; VETTERLEIN D.; WELLER U.; VOGEL H. J.; OSWALD S. E. When roots lose contact. **Vadose Zone Journal**, v. 8, p. 805-809, 2009.

CARMINATI A. & VETTERLEIN D. Plasticity of rhizosphere hydraulic properties as a key for efficient utilization of scarce resources. **Annals of Botany**, v. 112, p. 277-290, 2013.

CHANG W. C.; LEE T. Y.; HUANG H. D.; HUANG H. Y.; PAN R. L. PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group. **BMC Genomics**, v. 9, p. 561, 2008.

CHEN M.; WANG Q. Y.; CHENG X. G.; XU Z. S.; LI L. C.; YE X. G.; XIA L. Q.; MA Y.

Z. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 299-305, 2007.

CHEN T. H. & MURATA N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 499–505, 2008.

CHEN H.; HWANG J. E.; LIM C. J.; KIM D. Y.; LEE S. Y.; LIM C. O. Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, p. 238-244, 2010.

CHEW Y. H. & HALLIDAY K. J. A stress-free walk from Arabidopsis to crops. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2011.

CHINNUSAMY V.; ZHU J. & ZHU J. K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends Plant Science**, v. 12, p. 444-451, 2007.

CHINNUSAMY V. & ZHU J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 133–139, 2009.

CHOI H.; HONG J.; HA J.; KANG J.; KIM S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1723–30, 2000.

CHOU H.; TAM M. F.; CHIANG C. H.; CHOU C. T.; TAI H. Y.; SHEN H. D. Transaldolases are novel and immunoglobulin E cross-reacting fungal allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, p. 739-749, 2011.

CHRISTMANN A.; GRILL E.; HUANG J. Hydraulic signals in long-distance signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 293–300, 2013.

COCHARD H.; FROUX F.; MAYR S.; COUTAND C. Xylem wall collapse in water-stressed pine needles. **Plant Physiology**, v. 134, p. 401–408, 2004.

COEGO A.; RAMIREZ V.; GIL M. J.; FLORS V.; MAUCH-MANI B.; VERA P. An Arabidopsis homeodomain transcription factor, OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3, mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. **The Plant Cell Online**, v. 17, p. 2123–2137, 2005.

COELLO P.; HEY S. J.; HALFORD N. G. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. **Journal of Experimental Botany**, n. 62, p. 883–893, 2011.

COELLO P.; HIRANO E.; HEY S. J.; MUTTUCUMARU N.; MARTINEZ-BARAJAS E.; PARRY M. A. J.; HALFORD N. G. Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 913–924, 2012.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, p. 30, 2012

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acessado em 31 de janeiro de 2014.

CONDON A. G.; RICHARDS R. A.; REBETZKE G. J.; FARQUHAR G. D. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. **Crop Science**, v. 42, p. 122-131, 2002.

CONG L.; ZHENG H. C.; ZHANG Y. X.; CHAI T. Y. Arabidopsis DREB1A confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in Tobacco. **Plant Science**, v. 174, p. 156-164, 2008.

COUÉE I.; SULMON C.; GOUESBET G.; EL AMRANI A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 449–459, 2006.

CRUSIOL L. G. T.; CARVALHO J. F. C. & FARIAS J. R. B. Análise da disponibilidade hídrica na fazenda da Embrapa Soja (Londrina, PR) nas safras de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012, p. 99–107, 2012.

CUI X. H.; HAO F. S.; CHEN H.; CHEN J.; WANG X. C. Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. **Journal of Plant Research**, v. 121, p. 207–214, 2008.

CUTLER S. R.; RODRIGUEZ P. L.; FINKELSTEIN R. R.; ABRAMS S. R. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 651–679, 2010.

DALDOUL S.; GUILLAUMIE S.; REUSTLE G. M.; KRCZAL G.; GHORBEL A.; DELROT S.; MLIKI A.; HÖFER M. U. Isolation and expression analysis of salt induced genes from contrasting grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. **Plant Science**, v. 179, n. 489-498, 2010.

DEGENKOLBE T.; DO P. T.; KOPKA J.; ZUTHER E.; HINCHA D. K.; KÖHL K. I. Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. **PloS One**, v. 8, p. e63637, 2013.

DEVI M. J.; SINCLAIR T. R. & VADEZ V. Genotypic variation in peanut for transpiration response to vapor pressure deficit. **Crop Science**, v. 50, p. 191–196, 2010.

DEVI M. J.; Bhatnagar-Mathur P.; Sharma K. K.; Serraj R.; Anwar S. Y.; Vadez V. Relationships between transpiration efficiency and its surrogate traits in the *rd29A*: *DREB1A* transgenic lines of groundnut. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, p. 272-283, 2011.

DING HD.; ZHANG HJ.; ZHU XH.; LIU H.; LIANG JS.; LU B. Involvement of calcium and calmodulin signaling in adaptation to heat stress-induced oxidative stress in

- Solanum lycopersicum* L. leaves. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 3259-3269, 2012.
- DIVI U. K.; RAHMAN T. & KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 151, 2010.
- DOUSSAN C.; VERCAMBRE G.; PAGES L. Modelling of the hydraulic architecture of root systems: an integrated approach to water absorption: distribution of axial and radial conductances in maize. **Annals of Botany**, v. 81, p. 225-232, 1998.
- DU Q. L.; CUI W. Z.; ZHANG C. H.; YU D. Y. *GmRFP1* encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase in Soybean (*Glycine max*). **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 685-693, 2010.
- DU H.; YANG S. S.; LIANG Z.; FENG B. R.; LIU L.; HUANG Y. B.; TANG Y. X. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 106, 2012.
- DUBOS C.; STRACKE R.; GROTEWOLD E.; WEISSHAAR B.; MARTIN C.; LEPINIEC L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 573–581, 2010.
- DURAND J. L.; SHEEHY J. E.; MINCHIN F. R. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. **Journal of Experimental Botany**, n. 38, p. 311 – 321, 1987.
- DURANTI M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67–82, 2006.
- DUVICK D. N. The Contribution of Breeding to Yield Advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in Agronomy**, v. 86, p. 83-145, 2005.
- EDDY S.R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics**, v. 14, p. 755–63, 1998.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja (2010) Cultivares de Soja: Regiões Sul e Central do Brasil 2010/2011. Londrina, Pr.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível no site <[www.cnpso.embrapa.br](http://www.cnpso.embrapa.br)> 2013.
- ENGELS C.; FUGANTI-PAGLIARINI R.; MARIN S. R. R.; MARCELINO-GUIMARÃES F. C.; OLIVEIRA M. C. N.; KANAMORI N.; MIZOI J.; NAKASHIMA K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; NEPOMUCENO A. L. Introduction of the *rd29A: AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 556-565, 2013.
- FARIAS J. R. B.; NEUMAIER N.; NEPOMUCENO A. L.; DELATRE N.; BORDINGNON J. R.; OYA T.; ZAPAROLI M. L. M.; CASAGRANDE E. C. Respostas

da Cultura da Soja à Disponibilidade Hídrica. **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja**, n. 142, p. 73-76, 1999.

FEHR W. R.; CAVINESS C. E.; BURMOOD D. T.; PERNNIGTON J. S. Stage of development description for soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Crop Science**, n. 11, p. 929-931, 1971.

FERREIRA D.F. Sisvar versão 5.3 (Biud 75). Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. **Lavras, MG**, Universidade Federal de Lavras, 2010.

FISHER D. B. An unusual layer of cells in the mesophyll of soybean leaf. **Botanical Gazette**, n. 128, p. 215-218, 1967.

FLETCHER A. L.; SINCLAIR T. R.; ALLEN L. H. Transpiration responses to vapour pressure deficit in well watered 'slow-wilting' and commercial soybean. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 145 – 151, 2007.

FLEXAS J.; BOTA J.; LORETO F.; CORNIC G.; SHARKEY T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, n. 6, p. 269-279, 2004.

FUGANTI-PAGLIARINI R.; CARVALHO J. F. C.; ROLLA-SANTOS A. A. P.; ENGELS C.; MOLINARI M. D. C.; VASQUEZ G.; MARIN S. R. R.; KANAMORI N.; FARIAS J. R. B.; NEUMAIER N.; OLIVEIRA M. C. N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; NEPOMUCENO A. L. Análise fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os genes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico em condições experimentais de campo. In: Mercosoja, 2011, Rosário, Argentina, 2011.

FUJII H.; VERSLUES P. E. & ZHU J. K. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, n. 19, p. 485-94, 2007.

FUJITA M.; FUJITA Y.; MARUYAMA K.; SEKI M.; HIRATSU K.; OHME-TAKAGI M.; TRAN L. S. P.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **The Plant Journal**, v. 39, p. 863–876, 2004.

FURIHATA T.; MARUYAMA K.; FUJITA Y.; UMEZAWA T.; YOSHIDA R.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 1988-93, 2006.

GALMÉS J.; MEDRANO H. & FLEXAS J. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. **New Phytologist**, v. 175, p. 81-93, 2007.

GAO S. Q.; CHEN M.; XIA L. Q.; XIU H. J.; XU Z. S.; LI L. C.; ZHAO C. P.; CHENG

X. G.; MA Y. Z. A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, *GhDREB*, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. **Plant Cell Reports**, n. 28, p. 301-311, 2009.

GAO T.; WU Y.; ZHANG Y.; LIU L.; NING Y.; WANG D.; TONG H.; CHEN S.; CHU C.; XIE Q. *OsSDIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. **Plant Molecular Biology**, v. 76, p. 145–156, 2011.

GARAY A. F. & WILHELM W. W. Root system characteristics of two soybean isolines undergoing water stress conditions. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 973 – 977, 1983.

GARG A. K.; KIM J. K.; OWENS T. G.; RANWALA A. P.; CHOI Y. D.; KOCHIAN L. V.; WU R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 99, p. 15898–15903, 2002.

GARRIGUES E.; DOUSSAN C. & PIERRET A. Water uptake by plant roots: I - Formation and propagation of a water extraction front in mature root systems as evidenced by 2D light transmission imaging. **Plant Soil**, v. 283, p. 83-98, 2006.

GEIGER D.; SCHERZER S.; MUMM P.; STANGE A.; MARTEN I.; BAUER H.; ACHE P.; MATSCHI S.; LIESE A.; AL-RASHEID K. A. S.; ROMEIS T.; HEDRICH R. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 106, p. 21 425–21 430, 2009.

GENEVESTIGATOR\_ <https://www.genevestigator.com/gv>.

GHASSEMI-GOLEZANI K. & FARSHBAF-JAFARI S. Influence of water deficit on oil and protein accumulation in soybean grains. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 2, p. 46-52, 2012.

GILBERT M. A.; ZWIENIECKI M. A. & HOLBROOK M. N. Independent variation in photosynthesis capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2875-2887, 2011.

GILMOUR S. J.; ZARKA D. G.; STOCKINGER E. J.; SLAZAR M. P.; HOUGHTON J. M.; TOMASHOW M. F. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. **The Plant Journal**, v. 16, p. 433-442, 1998.

GOLLDACK D.; LÜKING I. & YANG O. (2011) Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1383- 1391, 2011.

GONZALEZ E. M.; GORDON A. J.; JAMES C. L.; ARRESE-LGOR C. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 1515-1523, 1995.

GONZALEZ-DUGO M. P.; MORAN M. S.; MATEOS L.; BRYANT R. Canopy temperature variability as an indicator of crop water stress severity. **Irrigation Science**, v. 24, p. 233–240, 2005.

GUAN Y. S.; SERRAJ R.; LIU S. H.; XU J. L.; ALI J.; WANG W. S.; VENUS E.; ZHU L. H.; LI Z. K. Simultaneously improving yield under drought stress and non-stress conditions: a case study of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 4145–4156, 2010.

GUSMAROLI G.; TONELLI C. & MANTOVANI R. Regulation of novel members of the *Arabidopsis thaliana* CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. **Gene**, v. 283, p. 41–48, 2002.

GUTZAT R. & SCHEID O. M. Epigenetic responses to stress: triple defense? **Current Opinion in Plant Biology**, 2012.

HA C. V.; LE D. T.; NISHIYAMA R.; WATANABE Y.; TRAN U. T.; DONG N. V.; TRAN L. S. P. Characterization of the Newly Developed Soybean Cultivar DT2008 in Relation to the Model Variety W82 Reveals a New Genetic Resource for Comparative and Functional Genomics for Improved Drought Tolerance. **BioMed Research International**, p. 1-8, 2013.

HAAKE V.; COOK D.; RIECHMANN J. L.; PINEDA O.; THOMASHOW M. F.; ZHANG J. Z. Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 130, p. 639-648, 2002.

HANIN M.; BRINI F.; EBEL C.; TODA Y.; TAKEDA S.; MASMOUDI K. Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 1503-1509, 2011.

HARE P. D. & CRESS W. A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79–102, 1997.

HEINE G. F.; HERNANDEZ J. M. & GROTEWOLD E. Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 37878–37885, 2004.

HETHERINGTON A. M. & WOODWARD F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, p. 901–908, 2003.

HILBRICHT T.; VAROTTO S.; SGARAMELLA V.; BARTELS D.; SALAMINI F.; FURINI A. Retrotransposons and siRNA have a role in the evolution of desiccation tolerance leading to resurrection of the plant *Craterostigma plantagineum*. **New Phytologist**, v. 179, p. 877-887, 2008.

HIMMELBACH A.; HOFFMANN T.; LEUBE M.; HÖHENER B.; GRILL E. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. **EMBO Journal**, v. 21, p. 3029–38, 2002.

HIRAYAMA T. & SHINOZAKI K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trends in Plant Science**, v. 12, p. 343–351, 2007.

HIRAYAMA T. & SHINOZAKI K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. **The Plant Journal**, v. 61, p. 1041–1052, 2010.

HONG J. K.; CHOI H. W.; HWANG I. S.; HWANG B. K. Role of a novel pathogen-induced pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, CaRFP1, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 571–588, 2007.

HOQUE M. A.; BANU M. N.; OKUMA E.; AMAKO K.; NAKAMURA Y.; SHIMOISHI Y.; MURATA Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco bright yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1457–1468, 2007.

HOU X.; XIE K. B.; YAO J. L.; QI Z. Y.; XIONG L. Z. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 106, p. 6410–6415, 2009.

HOUDE M.; DHINDSA R. S. & SARHAN F. A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. **Molecular and General Genetic**, v. 234, p. 43-48, 1992.

HOWARTH C. J. Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: *Abiotic Stresses Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches* (Eds M. Ashraf, P.J.C.Harris). Howarth Press, New York, USA, 2005.

HU H.; BOISSON-DERNIER A.; ISRAELSSON-NORDSTROM M.; BOHMER M.; XUE S.; RIES A.; GODOSKI J.; KUHN J. M.; SCHROEDER J. I. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells. **Nature Cell Biology**, v. 12, p. 87–93, 2010.

HUANG B. & EISSENSTAT D. M. (2000) Root plasticity in exploiting water and nutrient heterogeneity. *Plant-Environment Interactions* (Ed. R.E. Wilkinson). Dekker Press, New York, USA, 2000.

HUANG G. T.; MA S. L.; BAI L. P.; ZHANG L.; MA H.; JIA P.; LIU J.; ZHONG M.; GUO Z. F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 969–987, 2012.

HUBBARD K. E.; NISHIMURA N.; HITOMI K.; GETZOFF E. D.; SCHROEDER J. I. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. **Genes & Development**, v. 24, p. 1695–1708, 2010.

HUFSTETLER E. V.; BOERMA H. R.; JR CARTER T. E.; EARL H. J. Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean.

**Crop Science**, v. 47, p. 27-35, 2007.

HUNDERTMARK M. & HINCHA D. K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 9, p. 118, 2008.

HUNDERTMARK M.; DIMOVA R.; LENGEFELD J.; SECKLER R.; HINCHA D. K. The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from *Arabidopsis thaliana* modulates membrane stability through binding and folding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 446–453, 2011.

HUNTER S.; APWEILER R.; ATTWOOD T. K.; BAIROCH A.; BATEMAN A.; BINNS D.; BORK P.; DAS U.; DAUGHERTY L.; DUQUENNE L.; FINN R. D.; GOUGH J.; HAFT D.; HULO N.; KAHN N.; KELLY E.; LAUGRAUD A.; LETUNIC I.; LONSDALE D.; LOPEZ R.; MADERA M.; MASLEN J.; MCANULLA C.; MCDOWALL J.; MISTRY J.; MITCHELL A.; MULDER N.; NATALE D.; ORENGO C.; QUINN A. F.; SELENGUT J. D.; SIGRIST C. J. A.; THIMMA M.; THOMAS P. D.; VALENTIN F.; WILSON D.; WU C. H.; YEATS C. InterPro: the integrative protein signature database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D211-D215, 2009.

HWANG I. S.; AN S. H. & HWANG B. K. Pepper *asparagine synthetase 1 (CaAS1)* is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. **The Plant Journal**, v. 67, p. 749-762, 2011.

IKEDA T.; OHNISHI S.; SENDA M.; MIYOSHI T.; ISHIMOTO M.; KITAMURA K.; FUNATSUKI H. A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 1477–1488, 2009.

ISMAIL A. M.; HALL A. E.; & CLOSE T. J. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13566-13570, 1999.

ISODA A. & WANG P. W. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. **Plant Production Science**, v. 5, p. 224–228, 2002.

ITO Y.; KATSURA K.; MARUYAMA K.; TAJI T.; KOBAYASHI M.; SEKI M.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 141-153, 2006.

JAMES R. A.; DAVENPORT R. J. & MUNNS R. Physiological characterization of two genes for Na<sup>+</sup> exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1537-1547, 2006.

JAMES A. T.; LAWN R. J. & COOPER M. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. I. Variation in soybean and wild *Glycine* spp. for epidermal conductance, osmotic potential, and relative water content. **Crop and Pasture Science**, v. 59, p. 656–669, 2008.

JENNINGS D. H. The effects of sodium chloride on higher plants. **Biology Review**, v. 51, p. 453–486, 1976.

JIANG Q.; ZHANG JY.; GUO X.; BEDAIR M.; SUMNER L.; BOUTON J.; WANG Z. Y. Improvement of drought tolerance in white clover (*Trifolium repens*) by transgenic expression of a transcription factor gene WXP1. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 157–165, 2010.

JIN J.; LIU X.; WANG G.; MI L.; SHEN Z.; CHEN X.; HERBERT S. J. Agronomic and physiological contributions to the yield improvement of soybean cultivars released from 1950 to 2006 in Northeast China. **Field Crops Research**, v. 115, p. 116–123, 2010.

JOHNSON R. R.; WAGNER R. L.; VERHEY S. D.; WALKER-SIMMONS M. K. The Abscisic Acid-Responsive Kinase PKABA1 Interacts with a Seed-Specific Abscisic Acid Response Element-Binding Factor, TaABF, and Phosphorylates TaABF Peptide Sequences. **Plant Physiology**, v. 130, p. 837–46, 2002.

KASUGA M.; MIURA S.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 346–350, 2004.

KATUL G.; MANZONI S.; PALMROTH S.; OREN R. A stomatal optimization theory to describe the effects of atmospheric CO<sub>2</sub> on leaf photosynthesis and transpiration. **Annals of Botany**, v. 105, p. 431–442, 2010.

KEERIO I. M.; CHANG Y. S.; MIRJAT M. A.; LAKHO M. H.; BHATTI I. P. The rate of nitrogen fixation in soybean root nodules after heat stress and recovery period. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 3, p. 512–514, 2001.

KHAN M. S. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, p. 2433–442, 2011.

KHOLOVÁ J.; HASH C. T.; KAKKERA A.; KOCO VÁ M.; VADEZ V. Constitutive water conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet [*Pennisetum americanum* (L.) R Br.]. **Journal of Experimental Botany**, v. 61: 369–377, 2010.

KHOLOVÁ J.; HASH C. T.; KUMAR P. L.; YADAV R. S.; KOCO VÁ M.; VADEZ V. Terminal drought tolerant pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R Br.) have high leaf ABA and limit transpiration at high vapor pressure deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 1431–1440, 2010.

KIM S. Y. & NAM K. H. Physiological roles of ERD10 in abiotic stresses and seed germination of *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 203–209, 2010.

KING C. A. & PURCELL L. C. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and aminoacids. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1389 – 1396, 2005.

KIZIS D. & PAGES M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant Journal**, v. 30, p. 679–89, 2002.

KIYOSUE T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, p. 225–231, 1994.

KOBAYASHI Y.; MURATA M.; MINAMI H.; YAMAMOTO S.; KAGAYA Y.; HOBO T.; YAMAMOTO A.; HATTORI T. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element binding factors. **The Plant Journal**, v. 44, p. 939–49, 2005.

KOTAK S.; VIERLING E.; BÄUMLEIN H.; VON KOSKULL-DÖRING P. A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, p. 182–195, 2007.

KOTAK S.; LARKINDALE J.; LEE U.; VON KOSKULL-DORING P.; VIERLING E.; SCHARF K. D. Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 310–316, 2007.

KOVACS D.; KALMAR E.; TOROK Z.; TOMPA P. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. **Plant Physiology**, v. 147, p. 381–390, 2008.

KOZLOWSKA M. Plant Physiology. From theory to applied sciences (in Polish). PWRiL, Warsaw, Poland, 2007.

KRÓL A. The growth and water uptake by yellow seed and black seed rape depending on the state of soil compaction. Ph.D. Thesis, Bohdan Dobrzański Institute of Agrophysics PAS, Lublin, Poland, 2013.

KULCHESKI F. R.; OLIVEIRA L. F. V.; MOLINA L. G.; ALMERA M. P.; RODRIGUES F. A.; MARCOLINO J.; BARBOSA J. F.; STOLF-MOREIRA R.; NEPOMUCENO A. L.; MARCELINO-GUIMARAES F. C.; ABDELNOOR R. V.; NASCIMENTO L. C.; CARAZZOLLE M. F.; PEREIRA G. A. G.; MARGIS R. Identification of novel soybean *microRNAs* involved in abiotic and biotic stresses. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1–17, 2011.

KWON C. S.; LEE D.; CHOI G.; CHUNG W. I. Histone occupancy dependent and - independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 1, p. 112: 121, 2009.

LABHILILI M.; JOUDRIER P. & GAUTIER M. F. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. **Plant Science**, v. 112 p. 219–230, 1995.

LAURIE-BERRY N.; JOARDAR V.; STREET I. H.; KUNKEL B. N. The *Arabidopsis*

*thaliana* **JASMONATE INSENSITIVE 1** gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 789–800, 2006.

LAWLOR D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 83-108, 2013.

LE D. T.; NISHIYAMA R.; WATANABE Y.; TANAKA M.; SEKI M.; HAM L. H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K.; TRAN L. S. P. Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. **PLOS One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

LEE S. H.; KIM J. C.; LEE M. S.; HEO W. D.; SEO H. Y.; YOON H. W.; HONG J. C.; LEE S. Y.; BAHK J. D.; HWANG I.; CHO M. J. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 21806-21812, 1995.

LEE S. C.; LAN W. Z.; BUCHANAN B. B.; LUAN S. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 106, p. 21419–21424, 2009.

LEE S. C. & LUAN S. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. **Plant, Cell and Environment**, v. 35, p. 53–60, 2012.

LEGAY S.; LEFÈVRE I.; LAMOUREUX D.; BARREDA C.; LUZ R. T.; GUTIERREZ R.; QUIROZ R.; HOFFMANN L.; HAUSMAN J. F.; BONIERBALE M.; EVERS D.; SCHAFLEITNER R. Carbohydrate metabolism and cell protection mechanisms differentiate drought tolerance and sensitivity in advanced potato clones (*Solanum tuberosum* L.). **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, p. 275-291, 2011.

LEMOIS L. B.; FARINELLI R.; CAVARIANI C.; ZAPPAROLI R. A. Desempenho agrônomo e produtivo de cultivares de soja em diferentes safras. **Científica**, v. 39, p. 44 – 51. 2011.

LEPRINCE O.; DELTOUR R.; THORPE P. C.; ATHERTON N. M.; HENDRY G. A. F. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 116, p. 573–580, 1990.

LI W. X.; OONO Y.; ZHU J.; HE X. J.; WU J. M.; IIDA K.; LU X. Y.; CUI X.; JIN H.; ZHU J. K. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. **The Plant Cell Online**, v. 20, p. 2238-2251, 2008.

LI Z.; BALDWIN C. M.; HU Q.; LIU H.; LUO H. Heterologous expression of *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping

- bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 272–289, 2010.
- LI F.; XING S.; GUO Q.; ZHAO M.; ZHANG J.; GAO Q.; WANG G.; WANG W. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 960-966, 2011.
- LIENER, I. E. (1994) Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, p. 31–67, 1994.
- LIM C. J.; LEE H. Y.; KIM W. B.; LEE B. S.; KIM J.; AHMAD R.; KIM H. A.; YI S. Y.; HUR C. G.; KWON S. Y. Screening of tissue-specific genes and promoters in tomato by comparing genome wide expression profiles of Arabidopsis orthologues. **Molecules and Cells**, v. 34, p. 53-59, 2012.
- LIPIEC J.; DOUSSAN C.; NOSALEWICZ A.; KONDRACKA K. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. **International Agrophysics**, v. 27, p. 463-477, 2013.
- LIU Q.; KASUGA M.; SAKUMA Y.; ABE H.; MIURA S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, v. 10, p. 1391-1406, 1998.
- LIU F.; ANDERSEN M. N. & JENSEN C. R. Loss of pod set caused by drought stress is associated with water status and ABA content of reproductive structures in soybean. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 271 – 280.
- LIU X. B.; JIN J.; WANG G. H.; HERBERT S. J. Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. **Field Crop Research**, v. 105, p. 157–171, 2008.
- LIU H. T.; GAO F.; LI G. L.; HAN J. L.; LIU D. L.; SUN D. Y.; ZHOU R. G. The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 55, p. 760-773, 2008.
- LIU Y. C.; WU Y. R.; HUANG X. H.; SUN J.; XIE Q. *AtPUB19*, a U-Box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, v. 4, p. 938-946, 2011.
- LIVAK K. J. & SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPATO S. & LANGRIDGE P. Engineering Stress Tolerance in Cereals Using DREB/CBF Genes: Outcomes, Problems and Perspectives. **ISB News Report**, p. 7-9, 2011.
- LU C. & ZHANG J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry

and its thermostability in wheat plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 1199-1206, 1999.

LUDLOW M. M. & MUCHOW R. C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water- limited environments. **Advances in Agronomy**, v. 43, p. 107–153, 1990.

MACROBBIE E. A. C. Signal transduction and ion channels in guard cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 353, p. 1475–1488, 1998.

MALEK M. A.; MONDAL M. M. A.; ISMAIL M. R.; RAFII M. Y.; BERAHIM Z. Physiology of seed yield in soybean: Growth and dry matter production. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7643-7648, 2012.

MANAVALAN L. P.; GUTTIKONDA S. K.; TRAN L. S. P.; NGUYEN H. T. Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. **Plant & Cell Physiology**, v. 50, p. 1260-1276, 2009.

MANAVELLA P. A.; ARCE A. L.; DEZAR C. A.; BITTON F.; RENO J. P.; CRESPI M.; CHAN R. L. Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. **The Plant Journal**, v. 48, p. 125-137, 2006.

MANFRE A. J.; LANNI L. M. & MARCOTTE W. R. J. The Arabidopsis group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein ATEM6 is required for normal seed development. **Plant Physiology**, v. 140, p. 140–149, 2006.

MANTOVANI, R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. **Gene**, v. 239, p. 15–27, 1999.

MARUYAMA K.; TODAKA D.; MIZOI J.; YOHISDA T.; KIDOKORO S.; MATSUKURA S.; TAKASAKI H.; SAKURAI T.; YAMAMOTO Y. Y.; YOSHIWARA K.; KOJIMA M.; SAKAKIBARA H.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Identification of *cis*-acting promoter elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. **DNA Research**, v. 19, p. 37–49, 2012.

MASLE J.; GILMORE S. R. & FARQUHAR G. D. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. **Nature**, v. 436, p. 860–870, 2005.

MATYSIK J.; BHALU B. & MOHANTY P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v. 82, p. 525–532, 2002.

MAUREL C.; SIMONNEAU T. & SUTKA M. The significance of roots as hydraulic rheostats. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3191-3198, 2010.

MCCULLY M. E.; CANNY M. J. & HUANG C. X. Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology. Morphological and anatomical applications. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 97-124, 2009.

MECKEL L.; EGLI D. B.; PHILLIPS R. E.; RADCLIFFE D.; LEGGETT J. E. Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 1027 – 1031, 1984.

MELCHIORRE M.; ROBERT G.; TRIPPI V.; RACCA R.; LASCANO H. R. Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. **Plant Growth Regulation**, v. 57, p. 57–68, 2009.

MIAN M. A. R.; BAILEY M. A.; ASHLEY D. A.; WELLS R.; CARTER T. E.; PARROT W. A.; BOERMA H. R. Molecular markers associated with water use efficiency and leaf ash in soybean. **Crop Science**, v. 36, p. 1252 – 1257, 1996.

MILLER G.; SUZUKI N.; CIFTCI-YILMAZ S.; MITTLER R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

MOLINARI H. B. C.; MARUR C. J.; DAROS E.; CAMPOS M. K. F.; CARVALHO J. F. R. P.; FILHO J. C. B.; PEREIRA L. F. P.; VIEIRA L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218–229, 2007.

MORIMOTO K.; MIZOI J.; QIN F.; KIM J. S.; SATO H.; OSAKABE Y.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A Is Required but Not Sufficient for the Induction of Target Genes under Conditions of Stress. **PLoS One**, v. 8, p. e80457, 2013.

MULLER B.; PANTIN F.; GÉNARD M.; TURC O.; FREIXES S.; PIQUES M.; GIBON Y. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1715-1729, 2011.

MUNNÉ-BOSCH S. & ALEGRE L. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, v. 210, p. 925–931, 2000.

NAKASHIMA K.; TRAN L. S. P.; NGUYEN V. D.; FUJITA M.; MARUYAMA K.; TODAKA D.; ITO Y.; HAYASHI N.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress responsive gene expression in rice. **The Plant Journal**, v. 51, p. 617 – 630, 2007.

NAKASHIMA K.; ITO Y. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. **Plant Physiology**, v. 149, p. 88-95, 2009.

NAKASHIMA K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. ABA signaling in stress-response and seed development. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 959-970, 2013.

NAYA L.; LADRERA R.; RAMOS J.; GONZALEZ E. M.; ARRESE-IGOR C.; MINCHIN F. R.; BECANA M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to subsequent recovery of plants. **Plant Physiology**, v. 144, p. 1104 – 1114, 2007.

NELSON D. E.; REPETTI P. P.; ADAM T. R.; CREELMAN R. A.; WU J.; WARNER D. C.; ANSTROM D. C.; BENSON R. J.; CASTIGLIONI P. P.; DONNARUMMO M. G.; HINCHEY B. S.; KUMIMOTO R. W.; MASZLE D. R.; CANALES R. D.; KROLIKOWSKI K. A.; DOTZON S. B.; GUTTERSON N.; RATCLIFFE O. J.; HEARD J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water limited acres. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, p. 16450–16455, 2007.

NEPOMUCENO A. L.; OOSTERHUIS D. M.; & STEWART J. M. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. **Environmental and Experimental Botany**, v. 40, p. 29-41, 1998.

NEVES-BORGES A. C.; GUIMARÃES-DIAS F.; CRUZ F.; MESQUITA R. O.; NEPOMUCENO A. L.; ROMANO E.; LOUREIRO M. E.; GROSSI-DE-SÁ M. F.; ALVES-FERREIRA M. Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 212-221, 2012.

NGUYEN B.; BRAR D.; BUI B.; NGUYEN T.; PHAM L.; NGUYEN H. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa*; L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 583-593, 2003.

NULIT R. Over-expression of *Escherichia coli* Transaldolase in the Cytosol of *Arabidopsis thaliana*. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 35, p. 371-379, 2012.

NYLANDER M.; SVENSSON J.; PALVA E. T.; WELIN B. V. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 263–279, 2001.

OGATA H.; GOTO S.; SATO K.; FUJIBUCHI W.; BONO H.; KANEHISA M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 29-34, 1999.

OH S. J.; SONG S. I.; KIM Y. S.; JANG H. J.; KIM S. Y.; KIM M.; KIM Y. K.; NAHM B. H.; KIM J. K. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, v. 138, p. 341-351, 2005.

OSAKABE Y.; YAMAGUCHI □ SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K.; TRAN L. S. P. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. **New Phytologist**, 2013.

OSOSKI A. L. & KENNELLY E. J. Phytoestrogens: a review of the present state of

research. *Phytotherapy Research*. 17 : 84 – 869, 2003.

OYA T.; NEPOMUCENO A. L.; NEUMAIER N.; FARIAS J. R. B.; TOBITA S.; ITO O. Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars. **Plant Production Science**, v. 7, p. 129-137, 2004.

PAMMENTER N. W.; BERJAK P.; WESLEY-SMITH J.; WILLIGE C. V. Experimental aspects of drying and recovery. In *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (Black, M. and Pritchard, H., eds.). CABI Publishing. pp. 93–110, 2002.

PARK S. Y.; NOH K. J.; YOO J. H.; YU J. W.; LEE B. W.; KIM J. G.; SEO H. S.; PAEK N. C. Rapid upregulation of *dehydrin3* and *dehydrin4* in response to dehydration is a characteristic of drought tolerant genotypes in barley. **Journal of Plant Biology**, v. 49, p. 455-62, 2006.

PARK E. J.; JEKNIC Z.; PINO M. T.; MURATA N.; CHEN T. H. Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, p. 994–1005, 2007.

PARK H. S.; JEONG W. J.; KIM E. C.; JUNG Y.; LIM J. M.; HWANG M. S.; PARK E. J.; HA D. S.; CHOI D. W. Heat Shock Protein Gene Family of the *Porphyra seriata* and Enhancement of Heat Stress Tolerance by PsHSP70 in *Chlamydomonas*. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 332–342, 2012.

PASSIOURA J. B. The perils of pot experiments. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 1075–1079, 2006.

PASSIOURA J. B. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? **Functional Plant Biology**, v. 39, p. 851–859, 2012.

PELAH D.; WANG W.; ALTMAN A.; SHOSEYOV O.; BARTELS D. Differential accumulation of water stressrelated proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 153-159, 1997.

PENG X. X.; TANG X. K.; ZHOU P. L.; HU Y. J.; DENG X. B.; HE Y.; WANG H. H. Isolation and expression patterns of rice WRKY82 transcription factor gene responsive to both biotic and abiotic stresses. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, p. 893–901, 2011.

PEREZ-ALFOCEA F.; GHANEM M. E.; GOMEZ-CADENAS A.; DODD I. C. Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 15, p. 893–901, 2011.

PHANG T. H.; SHAO G. & LAM H. M. Salt tolerance in soybean. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 1196–1212. 2008.

PIETERSE C. M. J.; LEON-REYES A.; VAN DER ENT S.; VAN WEES S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical**

**Biology**, v. 5, p. 308–316, 2009.

PLANCHET E.; RANNOU O.; RICOULT C.; BOUTET-MERCEY S.; MAIA-GRONDARD A.; LIMAMI A. M. Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both abscisic acid (ABA)-dependent and independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 605-615, 2011.

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

PONTICELLI J.; BUSTOS P. & CAPRETTINI B. Agricultural Productivity and Structural Transformation. Evidence from Brazil. *Evidence from Brazil (August 13, 2013)*, 2013.

PRASAD P. V. V.; PISIPATI S. R.; RISTIC Z.; BUKOVNIK U.; FRITZ A. K. Impact of nighttime temperature on physiology and growth of spring wheat. **Crop Science**, v. 48, p. 2372-2380, 2008.

PRÁŠIL I. T.; PRÁŠILOVÁ P. & MAŘÍK P. Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. **Field Crops Research**, v. 102, p. 1-8, 2007.

PURCELL L. C. & KING C. A. Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, p. 969 – 993, 1996.

QIN F.; SAKUMA Y.; LI J.; LIU Q.; LI Y. Q.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1042-1052, 2004.

QIN F.; KAKIMOTO M.; SAKUMA Y.; MARUYAMA K.; OSAKABE Y.; TRAN L. S. P.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, v. 50, p. 54–59, 2007.

QIN F.; SAKUMA Y.; TRAN L. S. P.; MARUYAMA K.; KIDOKORO S.; FUJITA Y.; FUJITA M.; UMEZAWA T.; SAWANO Y.; MIYAZONO K.; TANOKURA M.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. **The Plant Cell Online**, v. 20, p. 1693-1707, 2008.

QIU Y. P. & YU D. Q. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. **Environmental and**

**Experimental Botany**, v. 65, p. 35–47, 2009.

QUACKENBUSH J. Microarray data normalization and transformation. **Nature Genetics**, v. 32, p. 496-501, 2002.

QUEVILLON E.; SILVENTOINEN V.; PILLAI S.; HARTE N.; MULDER N.; APWEILER R.; LOPEZ R. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research. 33 (Web Server issue)**, p. W116-W120, 2005.

RAMEDANI Z.; RAFIEE S. & HEIDARI M. D. An investigation on energy consumption and sensitivity analysis of soybean production farms. **Energy**, v. 36, p. 6340e6344, 2011.

RAMÍREZ V.; COEGO A.; LÓPEZ A.; AGORIO A.; FLORS V.; VERA P. Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the *OCP3* disease resistance regulator. **The Plant Journal**, v. 58, p. 578-591, 2009.

RAY J. D. & SINCLAIR T. R. Stomatal closure of maize hybrids in response to soil drying. **Crop Science**, v. 37, p. 803–807, 1997.

READ D. B.; BENGOUGH A. G.; GREGORY P. J.; CRAWFORD J. W.; ROBINSON D.; SCRIMGEOUR C. M. Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. **New Phytologist**, v. 157, p. 315-326, 2003.

REBETZKE G. J.; ELLIS M. H.; BONNETT D. G.; RICHARDS R. A. Molecular mapping of genes for coleoptile growth in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 1173–1183, 2007.

REDDY A. R.; RAMAKRISHNA W.; SEKHAR A. C.; ITHAL N.; BABU P. R.; BONALDO M. F.; SOARES M. B.; BENNETZEN J. L. Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Nagina 22). **Genome**, v. 45, p. 204-211, 2002.

RICHARDS R. A. Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. **Agricultural Water Management**, v. 80, p. 197–211, 2006.

RICHARDS R. A.; WATT M. & REBETZKE G. J. Physiological traits and cereal germplasm for sustainable agricultural systems. **Euphytica**, v. 154, p. 409–425, 2007.

ROBERTS J. K. & KEY J. L. Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene. **Plant Molecular Biology**, v. 16, p. 671-683, 1991.

RODRIGUES F. A.; MARCOLINO-GOMES J.; CARVALHO J. F. C.; NASCIMENTO L. C.; NEUMAIER N.; FARIAS J. R. B.; CARAZZOLLE M. F.; MARCELINO F. C.; NEPOMUCENO A. L. Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 304-314, 2012.

ROGERS S. O. & BENDICH A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin,

S.B., Schilperoort, R.A. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*, vol. A6. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1–10, 1988.

ROLLA A. A. P.; CARVALHO J. F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI R.; ENGELS C.; RIO A.; MARIN S. R. R.; OLIVEIRA M. C. N.; BENEVENTI M. A.; MARCELINO-GUIMARÃES F. C.; FARIAS J. R. B.; NEUMAIER N.; NAKASHIMA K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; NEPOMUCENO A. L. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research (in press)**, v. 23, p. 75-87, 2013.

ROLLINS J. A.; HABTE E.; TEMPLER S. E.; COLBY T.; SCHMID J.; KORFF M. Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3201-3212, 2013.

RORAT T. (2006) Plant dehydrins—tissue location, structure and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, p. 536–556.

ROSOLEM C. A. Água na cultura da soja. In: Boletim de Pesquisa de Soja. **Rondonópolis: Fundação Mato Grosso**, p. 95-102, 2005.

RUIBAL C.; SALAMÓ I. P.; CARBALLO V.; CASTRO A.; BENTANCOR M.; BORSANI O.; SZABADOS L.; VIDAL S. Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. **Plant Science**, v. 190, p. 89– 102, 2012.

SAAD R. B.; ROMDHAN W.B.; ZOUARI N.; AZAZA J.; MIEULET D.; VERDEIL J. L.; GUIDERDONI E.; HASSAIRI A. Promoter of the *AISAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus litoralis* directs developmental-regulated, stress-inducible, and organ-specific gene expression in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, v. 20, p. 1003-1018, 2011.

SACK L.; COWAN P. D.; JAIKUMAR N.; HOLBROOK N. M. The ‘hydrology’ of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 1343–1356, 2003.

SADOK W. & SINCLAIR T. R. Genetic variability of transpiration response to vapour pressure deficit among soybean cultivars. **Crop Science**, v. 49, p. 955–960, 2009.

SADRAS V. O. & MILROY S. P. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review. **Field Crops Research**, v. 47, p. 253-266, 1996.

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

SAKUMA Y.; LIU Q.; DUBOUZET J. G.; ABE H.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p.

998–1009, 2002.

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

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

SALLEO S.; LO GULLO M. A.; RAIMONDO F.; NARDINI A. Vulnerability to cavitation of leaf miner veins: any impact on leaf gas exchange? **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 851–859, 2001.

SALVUCCI M. E. & CRAFTS-BRANDNER S. J. (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1460-1470, 2004.

SAKURAI N.; ARA T.; OGATA Y.; SANO R.; OHNO T.; SUGIYAMA K.; HIRUTA A.; YAMAZAKI K.; YANO K.; AOKI K.; AHARONI A.; HAMADA K.; YOKOYAMA K.; KAWAMURA S.; OTSUKA H.; TOKIMATSU T.; KANEHISA M.; SUZUKI H.; SAITO K.; SHIBATA D. KaPPA-View4: a metabolic pathway database for representation and analysis of correlation networks of gene co-expression and metabolite co-accumulation and omics data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D677–84, 2011.

SARAVITZ D. M.; PHARR D. M. & CARTER T. E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, v. 83, p. 185-189, 1987.

SCHACHTMAN D. P. & GOODGER J. Q. D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends Plant Science**, v. 13, p. 281-287, 2008.

SCHARF K. D.; SIDDIQUE M. & VIERLING E. (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing  $\alpha$ -crystallin domains (Acd proteins). **Cell Stress & Chaperones**, v. 6, p. 225-237, 2001.

SCHMIDT J. J.; BLANKENSHIP E. E. & LINDQUIS J. L. Corn and Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Transpiration in Response to Drying Soil. **Weed Science**, v. 59, p. 50–54, 2011.

SCHENKE D.; BOTTCHE C. & SCHEEL D. Crosstalk between abiotic ultraviolet-B stress and biotic (flg22) stress signalling in *Arabidopsis* prevents flavonol accumulation in favor of pathogen defence compound production. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1849–1864, 2011.

SCHRAMM F.; LARKINDALE J.; KIEHLMANN E.; GANGULI A.; ENGLICH G.;

VIERLING E.; VON KOSKULL-DÖRING P. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 53, p. 264–274, 2008.

SEIBT U.; RAJABI A.; GRIFFITHS H. & BERRY J. A. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. **Oecologia**, v. 155, p. 441–454, 2008.

SEKHON H. S.; SINGH G.; SHARMA P.; BAINS T. S. Water Use Efficiency Under Stress Environments In: Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops (Eds S.S. Yadav, D.L. Mc Neil, R. Redden, and S.A. Patil). Springer Press, Dordrecht-Heidelberg-London-New York, 2010.

SEKI M.; UMEZAWA T.; URANO K.; SHINOZAKI K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 296–302, 2007.

SEO P. J.; XIANG F.; QIAO M.; PARK J. Y.; LEE Y. N.; KIM S. G.; LEE Y. H.; PARK W. J.; PARK C. M. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 151, p. 275–289, 2009.

SEO P. J. & PARK C. M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 186, p. 471–483, 2010.

SEO P. J.; LEE S. B.; SUH M. C.; PARK M. J.; GO Y. S.; PARK C. M. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1138–1152, 2011.

SEO M. & KOSHIBA T. Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 501–507, 2011.

SHEN B.; JENSEN R. G. & BOHNERT H. J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 113, p. 1177–1183, 1997a.

SHEN B.; JENSEN R. G.; BOHNERT H. J. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. **Plant Physiology**, v. 115, p. 527–532, 1997b.

SHIH M. D.; KAO M. H.; LIN S. C.; SHU T. F.; HSIEH K. L.; CHUNG M. C.; TSOU T. H.; HSING Y. I. C.; HSIEH J. S. Tissue- and cellular localization of soybean (*Glycine max* L.) seed maturation protein transcripts. **Botanical Studies**, v. 51, p. 183–194, 2010.

SHIH M. D.; HSIEH T. Y.; JIAN W. T.; WU M. T.; YANG S. J.; HOEKSTRA F. A.; HSING Y. I. C. Functional studies of soybean (*Glycine max* L.) seed LEA proteins GmPM6, GmPM11, and GmPM30 by CD and FTIR spectroscopy. **Plant Science**, v. 196, p. 152–159, 2012.

SHINOZAKI K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to drought and

cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 161–167, 1996.

SHINOZAKI K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses to drought stress. In *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants* (Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., eds). *Austin, TX: RG Landes*, 11-28, 1999.

SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SEKI M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 410-417, 2003.

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

SHINWARI Z. K.; NAKASHIMA K.; MIURA S.; KASUGA M.; SEKI M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low temperature-responsive gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, p. 161–170, 1998.

SHULTZ J. L.; RAY J. D.; SMITH J. R.; MENGISTU A. A soybean mapping population specific to the early soybean production system. **DNA Sequence**, v. 18, p. 104–111, 2007.

SINCLAIR T. R. & LUDLOW M. M. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 329 – 341, 1986.

SINCLAIR T. R.; HOLBROOK N. M.; ZWIENIECKI M. A. Daily transpiration rates of woody species on drying soil. **Tree Physiology**, v. 25, p. 1469-1472, 2005.

SKIRYCYZ A. & INZÉ D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 197-203, 2010.

SLAFER G. A.; ARAUS J. L.; ROYO C.; MORAL L. F. G. D. Promising ecophysiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments. **Annals of Applied Biology**, v. 146, p. 61–70, 2005.

SMIRNOFF N. & CUMBES Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057–2060, 1989.

SONG C. P.; AGARWAL M.; OHTA M.; GUO Y.; HALFTER U.; WANG P.; ZHU J. K. Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. **The Plant Cell**, v. 17, p. 2384–96, 2005.

SPECHT J. E. & WILLIAMS J. H. Contribution of genetic technology to soybean productivity-retrospect and prospect. In: Fehr, W.R. (Ed.), *Genetic Contributions to Yield Gains of Five Major Crop Plants*. CSSA Publ. 7. CSSA, Madison, WI, pp. 49–74, 1984.

- SPECHT J. E. & WILLIAMS J. H. Breeding for drought and heat resistance: prerequisites and examples. In World Soybean Research Conference III. Proceedings. Edited by Shibles , R. Westview Press , Boulder, CO, pp. 468 – 475, 1985.
- SPERRY J. S.; HACKE U. G.; WHEELER J. K. Comparative analysis of end wall resistance in xylem conduits. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 456–465, 2005.
- STIRZAKER R. J. & PASSIOURA J. B. The water relations of the root-soil interface. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, p. 201-208, 1996.
- STOLF-MOREIRA R.; LEMOS E. G. M.; ABDELNOOR R. V.; BENEVENTI M. A.; ROLLA A. A. P.; PEREIRA S. S.; OLIVEIRA M. C. N.; NEPOMUCENO A. L.; MARCELINO-GUIMARÃES F. C. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 58-65, 2011.
- SUNKAR R. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 805–811, 2010.
- SUZUKI N.; SEJIMA H.; TAM R.; SCHLAUCH K.; MITTLER R. Identification of the MBF1 heat-response regulon of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 66, p. 844-851, 2011.
- SWINDELL W. R; HUEBNER M. & WEBER A. P. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. **BMC Genomics**, v. 8, p. 125, 2007.
- TARDIEU F.; BRUCKLER L. & LAFOLIE F. Root clumping may affect the root water potential and the resistance to soil-root water transport. **Plant and Soil**, v. 140, p. 291-301, 1992.
- TARDIEU F. Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1-11, 2013.
- TAYLOR H. M.; BURNETT E. & BOOTH G. D. Taproot elongation rates of soybeans. **Z. Acker Pfl anzenbau Bd**, p. 146, 1978.
- TAYLOR H. M. & WILLATT S. T. Shrinkage of soybean roots. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 818-820, 1983.
- THIBAUD-NISSEN F.; SHEALY R. T.; KHANNA A.; VODKIN L. O. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. **Plant Physiology**, v. 132, p. 118-136, 2003.
- THORNTHWAITE C. W. & MATHER J. R. The Water Balance. **Climatology**, v. 8, p. 1-104, 1955.

- TRAN L. S. P.; NAKASHIMA K.; SAKUMA Y.; SIMPSON S. D.; FUJITA Y.; MARUYAMA K.; FUJITA M.; SEKI M.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Isolation and Functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. **The Plant Cell Online**, v. 16, p. 2481–98, 2004.
- TRAN L. S. P. & MOCHIDA K. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. **Functional & Integrative Genomics**, v. 10, p. 447-462, 2010.
- TSUDA M. & TYREE M. T. Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 823–828, 2000.
- TSUTSUI T.; KATO W.; ASADA Y.; SAKO K.; SATO T.; SONODA Y.; KIDOKORO S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; TAMAOKI M.; ARAKAWA K.; ICHIKAWA T.; NAKAZAWA M.; SEKI M.; SHINOZAKI K.; MATSUI M.; IKEDA A.; YAMAGUCHI J. DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in Arabidopsis. **Journal of Plant Research**, v. 122, p. 633–643, 2009.
- TUBEROSA R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-26, 2012.
- TUNNACLIFFE A. & WISE M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 791-812, 2007.
- 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 – 123, 2001.
- TYERMAN S. D.; NIEMIETZ C. M. & BRAMLEY H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 173–194, 2002.
- UNO Y.; FURIHATA T.; ABE H.; YOSHIDA R.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. 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 – USA**, v. 97, p. 11632 – 11637, 2000.
- URAO T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; URAO S.; SHINOZAKI K. An Arabidopsis *myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. **The Plant Cell Online**, v. 5, p. 1529-1539, 1993.
- URANO K.; KURIHARA Y.; SEKI M.; SHINOZAKI K. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 132-138, 2010.

USTUN A.; ALLEN F. L. & ENGLISH B. C. Genetic progress in soybean of the U.S. Midsouth. **Crop Science**, v. 41, p. 993–998, 2001.

VADEZ V. & SINCLAIR T. R. Leaf ureide degradation and N<sub>2</sub> fixation tolerance to water deficit in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 153–159, 2001.

VADEZ V.; KHOLOVA J.; CHOUDHARY S.; ZINDY P.; TERRIER M.; KRISHNAMURTH L.; KUMAR P. R.; TURNER N. C. Whole plant response to drought under climate change. In: Crop adaptation to climate change (Eds S.S. Yadav, R. Redden, J.L. Hatfield, H. Lotze-Campen, A.E. Hall). Chichester-Wiley-Blackwell, 2011.

VADEZ V.; BERGER J. D.; WARKENTIN T.; ASSENG S.; RATNAKUMAR P.; RAO K. P. C.; GAUR P. M.; MUNIER-JOLAIN N.; LARMURE A.; VOISIN A. S.; SHARMA H. C.; PANDE S.; SHARMA M.; KRISHNAMURTHY L.; ZAMAN M. A. Adaptation of grain legumes to climate change: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 31-44, 2012.

VALENTE M. A. S.; FARIA J. A. Q. A.; SOARES-RAMOS J. R. L.; REIS P. A. B.; PINHEIRO G. L.; PIOVESAN N. D.; MORAIS A. T.; MENEZES C. C.; CANO M. A. O.; FIETTO L. G.; LOUREIRO M. E.; ARAGÃO F. J. L.; FONTES E. P. B. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 533-546, 2009.

VANDELEUR R. K. & MAYO G. The Role of Plasma Membrane Intrinsic Protein Aquaporins in Water Transport through Roots: Diurnal and Drought Stress Responses Reveal Different Strategies between Isohydric and Anisohydric Cultivars of Grapevine. **Plant Physiology**, v. 149, p. 445-460, 2009.

VARSHNEY R. K.; HIREMATH P. J.; LEKHA P.; KASHIWAGI J.; BALAJI J.; DEOKAR A. A.; VADEZ V.; XIAO Y.; SRINIVASAN R.; GAUR P. M.; SIDDIQU K. H. M.; TOWN C. D.; HOISINGTON D. A. A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **BMC Genomics**, v. 10, p. 523, 2009.

VERNIERI P.; LENZI A.; FIGARO M.; TOGNONI F.; PARDOSSI A. How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2199-2206, 2001.

VINOCUR B. & ALTMAN A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 123–132, 2005.

VÍTÁMVÁS P.; KOSOVÁ K.; PRÁŠILOVÁ P.; PRÁŠIL I. T. Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9°C or 17°C in relation to their winter survival. **Plant Breeding**, v. 129, p. 611-616, 2010.

WAHID A. Physiological implications of metabolites biosynthesis in net assimilation and heat stress tolerance of sugarcane sprouts. **Journal of Plant Research**, v. 120,

p. 219-222, 2007.

WAHID A.; GELANI S.; ASHRAF M.; FOOLAD M. R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223, 2007.

WALTERS C.; FARRANT J. M.; PAMMENTER N. W.; BERJAK P. Desiccation stress and damage. In *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (Black, M. and Pritchard, H., eds.). **CABI Publishing**, p. 263–291, 2002.

WANG Q.; GUAN Y.; WU Y.; CHEN H.; CHEN F.; CHU C. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. **Plant Molecular Biology**, v. 67, p. 589–602, 2008.

WANG Y.; KIM S. G.; KIM S. T.; AGRAWAL G. K.; RAKWAL R.; KANG K. Y. Biotic Stress-Responsive Rice Proteome: An Overview. **Journal of Plant Biology**, v. 54, p. 219–226, 2011.

WARAICH E. A.; AHMAD R.; HALIM A.; AZIZ T. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 12, p. 221-244, 2012.

WARE D.; JAISWAL P.; NI J.; PAN X.; CHANG K.; CLARK K.; TEYTELMAN L.; SCHMIDT S.; ZHAO W.; CARTINHO S.; MCCOUCH S.; STEIN L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 103–105, 2002.

WEINER J. J.; PETERSON F. C.; VOLKMAN B. F.; CUTLER S. R. Structural and functional insights into core ABA signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 495–502, 2010.

WELIN B. V.; OLSON A.; NYLANDER M.; PALVA E. T. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 131–144, 1994.

WHALLEY H. J.; SARGEANT A. W.; STEELE J. F.; LACOERE T.; LAMB R.; SAUNDERS N. J.; KNIGHT H.; KNIGHT M. R. Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, v. 23, p. 4079-4095, 2011.

WILLIAMS J. H. & SPECHT J. E. A perspective on yield advances attributable to soybean variety development. In: *Agronomy Abstracts*. ASA, Madison, WI, p. 81, 1979.

WINFIELD M. O.; LU C. G.; WILSON I. D.; COGHILL J. A.; EDWARDS K. J. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 749-771, 2010.

WOO N. S.; BADGER M. R. & POGSON B. J. A rapid non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. **Plant Methods**, v. 4, p. 27, 2008.

- XIONG X.; JAMES V. A.; ZHANG H.; ALTPETER F. Constitutive expression of the barley *HvWRKY38* transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). **Molecular Breeding**, v. 25, p. 419–432, 2010.
- XU G. Y.; ROCHA P. S. C. F.; WANG M. L.; XU M. L.; CUI Y. C.; LI L. Y.; ZHU Y. X.; XIA X. A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in Arabidopsis. **Planta**, v. 234, p. 47–59, 2011.
- XUE N. Y.; LI E. H. & JIANG Y. The evolution tendency of agronomic characters of soybean cultivars released in Heilongjiang Province. **Soybean Science**, v. 25, p. 445–449, 2006.
- XUE Y.; PENG R.; XIONG A.; LI X.; ZHA D.; YAO Q. Yeast heat-shock protein gene *HSP26* enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 844-850, 2009.
- XUE Y.; PENG R.; XIONG A.; LI X.; ZHA D.; YAO Q. Over-expression of heat shock protein gene *hsp26* in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 54, p. 105-111, 2010.
- YADAV V.; MALLAPPA C.; GANGAPPA S. N.; BHATIA S.; CHATTOPADHYAY S. A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. **The Plant Cell Online**, v. 17, p. 1953–66, 2005.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **The Plant Cell Online**, v. 6, p. 251-264, 1994.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.
- YAMASAKI Y.; KOEHLER G.; BLACKLOCK B. J.; RANDALL S. K. Dehydrin expression in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 213-220, 2013.
- YANG S. Y.; SHIH M. D.; LIN T. P.; HSING Y. I. C. Two soybean (*Glycine max* L.) GmPM proteins reduce liposome leakage during desiccation. **Botanical Studies**, v. 52, p. 465-470, 2011.
- YE C.; ARGAYOSO M. A.; REDOÑA E. D.; SIERRA S. N.; LAZA M. A.; DILLA C. J.; MO Y.; THOMSON M. J.; CHIN J.; DELAVIÑA C. B.; DIAZ G. Q.; HERNANDEZ J. E. Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. **Plant Breeding**, v. 131, p. 33-41, 2012.
- YI N.; KIM Y. S.; JEONG M. H.; OH S. J.; JEONG J. S.; PARK S. H.; JUNG H.; CHOI Y. D.; KIM J. K. Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. **Planta**, v. 232, p. 743-754, 2010.

- YOO S. D.; YOUNG-HEE C. & JEN S. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature protocols**, v. 2, p. 1565–1572, 2007.
- YOSHIDA T.; FUJITA Y.; SAYAMA H.; KIDOKORO S.; MARUYAMA K.; MIZOI J.; SHINOZAKI K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. 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, p. 672–685, 2010.
- YUE B.; XUE W. Y.; XIONG L. Z.; YU X. Q.; LUO L. J.; CUI K. H.; JIN D. M.; XING Y. Z.; ZHANG Q. F. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. **Genetics**, v. 172, p. 1213–1228, 2006.
- ZAHUR M.; ASIF M. A.; ZEESHAN N.; MEHMOOD S.; MALIK M. F.; ASIF A. R. Homeobox leucine zipper proteins and cotton improvement. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 15–20, 2013.
- ZAMAN-ALLAH M.; JENKINSON D. M. & VADEZ V. A conservative pattern of water use, rather than deep or profuse rooting, is critical for the terminal drought tolerance of chickpea. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4239–4252, 2011.
- ZHANG W.; ZHOU R. G.; GAO Y. J.; ZHENG S. Z.; XU P.; ZHANG S. Q.; SUN D. Y. (2009) Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1773–1784, 2009.
- ZHANG P.; DREHER K.; KARTHIKEYAN A.; CHI A.; PUJAR A.; CASPI R.; KARP P.; KIRKUP V.; LATENDRESSE M.; LEE C.; MUELLER L. A.; MULLER R.; RHEE S. Y. Creation of a genome-wide metabolic pathway database for *Populus trichocarpa* using a new approach for reconstruction and curation of metabolic pathways for plants. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1479–1491, 2010.
- ZHAO M. R.; HAN Y. Y.; FENG Y. N.; LI F.; WANG W. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 671–685, 2012.
- ZHOU Q. Y.; TIAN A. G.; ZOU H. F.; XIE Z. M.; LEI G.; HUANG J.; WANG C. M.; WANG H. W.; ZHANG J. S.; CHEN S. Y. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, p. 486–503, 2008.
- ZHOU M. L.; ZHANG Q.; ZHOU M.; SUN Z. M.; ZHU X. M.; SHAO J. R.; TANG Y. X.; WU Y. M. Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize. **Glycobiology**, v. 22, p. 1775–1785, 2012.
- ZLATEV Z. & LIDON F. C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, p. 57–72, 2012.

ZWIENIECKY M. A.; MELCHER P. J. & HOLBROOK N. M. Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. **Science**, v. 291, p. 1059–1062, 2001.

## CAPÍTULO I

### 5 Phenotyping two Brazilian soybean cultivars contrasting in drought response as well as a transgenic line overexpressing *AtDREB2A CA*<sup>1</sup>

Cibelle Engels, Josirley de Fátima Corrêa Carvalho, Amanda Paiva Rôlla dos Santos, Norman Neumaier, Renata Fuganti-Pagliarini, Fabiana Aparecida Rodrigues, Marco Antonio Segantini Pieralisi, Maria Cristina Neves de Oliveira, Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães, José Renato Bouças Farias, Junya Mizoi, Kazuo Nakashima, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Alexandre Lima Nepomuceno.

#### 5.1 ABSTRACT

Water deficiency is one of the main abiotic factors that affect soybean crops. In this study, we analyzed drought-response mechanisms in two Brazilian soybean cultivars (BR 16 and Embrapa 48, which are considered drought-sensitive and drought-tolerant, respectively) as well as one transgenic line (D2A) that overexpresses the *AtDREB2A CA* gene for drought tolerance. The responses to drought were analyzed in a greenhouse after discontinuing irrigation of plants and in the field under four different water regimes: irrigated (I), natural conditions (NI), and under water stress applied in the vegetative stage (VS) or reproductive stage (RS) by using rain out shelters. The Embrapa 48 cultivar and the D2A line showed characteristics related to the conservative use of water under conditions of adequate water supply (drought avoidance). With the development of water deficit, the Embrapa 48 also showed characteristics related to drought tolerance (lowering of osmotic potential). In the field, the Embrapa 48 cultivar had greater productivity than the other cultivar studied. The productivity in the D2A line was 25.17% greater than in the BR 16 cultivar, although the differences were not statistically significant. The greatest differences between the BR 16 cultivar and the D2A line were related to the total number of pods and number of seeds, which were greater for the D2A line when stress was applied in the vegetative stage. Additional research is necessary to determine the climatic and soil conditions in which the productivity of the D2A line can surpass that of the drought-sensitive BR 16 cultivar.

**Key-words:** transgenic, drought-tolerant, conservative use of water

---

<sup>1</sup> Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Plant Physiology.

## 5.2 INTRODUCTION

Drought is the main abiotic stress factor that affects crop productivity. In the soybean crop, losses of 8.95 tons of grain occurred in the 2011/2012 crop season in Brazil because of the adverse climate conditions caused by the “La Niña” phenomenon (Conab, 2012). Furthermore, plants exhibit drought-responsive mechanisms, that should be considered: drought escape, drought avoidance, and drought tolerance (Yue et al., 2006). These mechanisms, in addition to drought survival, are outlined by Lawlor (2013).

According to Lawlor (2013), in annual crops such as cereals, the vegetative growth exploits the rainy period in regions with pronounced wet and dry seasons, and grain maturation occurs in the dry period, therefore, plants are able to escape from drought. Drought avoidance is shown by plants that grow in periods of drought but maintain their required water status, generally by restricting water loss (transpiration) and conserving soil water through a smaller leaf area and stomatal conductance and/or by increasing water supply, with deeper, denser rooting to exploit water in the soil or from a water table. Drought survival is a form of drought response in which cells, tissues, and organs that have ceased growing under drought (i.e., have entered a quiescent state) are able to maintain key cellular functions and recover rapidly to pre-deficit values with minimal damage, allowing resumption of activity (e.g., photosynthesis).

Mechanisms considered to confer drought tolerance by preserving cellular water content and turgor, even when water supply is limiting, include decreasing the osmotic potential with synthesis of proline and/or other osmoprotectors or increasing the water conductance of cells with aquaporins. Tolerance mechanisms of particular importance are those involved in the regulation of photosynthesis when stomatal conductance decreases at low relative water content (Lawlor 2013). Protective and regulatory mechanisms include those that increase energy dissipation and regulate the energy balance of cells (e.g., the xanthophyll cycle in photosynthetic tissues) and those that prevent the production or enhance the breakdown of reactive oxygen species (ROS) (Hou et al., 2009; Melchiorre et al., 2009).

Because plants exhibit different defense strategies against water deficit, numerous studies have focused on obtaining plants that are more tolerant to abiotic

stresses using genetic engineering and/or conventional breeding (Jiang et al., 2010; Xiong et al., 2010; Li et al., 2010, Nguyen et al., 2003, James et al., 2006).

Given the central role of the dehydration-responsive element-binding (DREB)/C-repeat-binding factor (CBF) transcription factors in responses to abiotic stress in addition to their ability to regulate a large number of stress-responsive genes, these transcription factors have become a common target for genetic engineering in plants (Lopato & Langridge, 2011). Numerous studies have mentioned that the overexpression of the transcription factor DREB2A or its constitutive active form *DREB2A CA* has increased the tolerance of numerous plant species to water, salt, and thermal stresses (Sakuma et al., 2006a, 2006b; Schramm et al., 2008; Qin et al., 2007; and Chen et al., 2007). *DREB2A CA* was obtained by Sakuma et al. (2006a) by deletion of the negative regulatory domain of the *DREB2A* gene of *Arabidopsis thaliana* between the nucleotides 135 and 166.

Target genes activated by the transcription factor DREB2A encode LEA proteins that protect macromolecules such as enzymes and lipids from dehydration (Shinozaki & Yamaguchi Shinozaki, 1999; Sakuma et al., 2006b) and heat-shock proteins (Sakuma et al., 2006b; Qin et al., 2007) and others.

Recently, Engels et al. (2013) inserted genes that encode the *DREB2A* transcription factors of *A. thaliana* in soybean cultivar BR 16 and detected its transcription in dehydration conditions. The present study aimed to elucidate drought-responsive mechanisms in a greenhouse using transgenic line (D2A) and comparing with the conventional cultivars BR 16 and Embrapa 48, which are considered sensitive and tolerant to drought, respectively. In addition, for the first time in the literature, the agronomic performance of these materials in field conditions was determined under different water regimes.

## **5.3 MATERIALS AND METHODS**

### **5.3.1 Plant material**

The soybean (*Glycine max* L. Merrill) conventional cultivars BR 16 (D69-B 10-M 58 x Davis), which is drought-sensitive (Oya et al., 2004), and Embrapa 48

[cruzamento (Davis x Paraná) x (IAS 4 x BR5)], which is drought-tolerant, were used in this study (Embrapa, 2010; Lemos et al., 2011; Kulcheski et al., 2011). In addition, a genetically modified soybean line, denominated D2A, which contained the *AtDREB2A* CA gene and the stress-inducible promoter *rd29A*, for tolerance to drought and heat was used. The expression of the *DREB2A* gene in the D2A line, generated by particle bombardment, was confirmed in generations T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> by Engels et al. (2013).

### 5.3.2 Experiment to induce water deficit

Soybean seeds were germinated in growth chambers at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 100% relative humidity (RH). After germination, the seedlings were transferred to 3-Kg pots containing a mixture of soil, organic material, and sand (2:2:1, 39% of field capacity [FC]). The plants were maintained at 70% FC (well-irrigated conditions) until the V<sub>4</sub> growth stage (Fehr et al. 1971).

To increase the atmospheric nitrogen-absorption efficiency, 2 mL of peat inoculant containing *Rizobium japonicum* (BIAGRO) was applied to each seedling.

The humidity and temperature conditions of the greenhouse were monitored every 5 minutes using a thermohygrograph (Hobo U14-002; Onset®). The photoperiod was 15h of light. The atmospheric vapor-pressure deficit (VPD) was calculated using the humidity and temperature data according to the formula  $\text{VPD} = (100 - \text{RH}) / 100 * \text{VPsat}$  (kPa). VP<sub>sat</sub> was calculated based on a psychometric graph using the software available at <http://physics.holsoft.nl/physics/ocmain.htm>.

Pots containing plants in the V<sub>4</sub> stage, 30 days after sowing (DAS), were divided into three subsets (1, 2, and 3) with two plants per genotype in each subset. The plants in subset 1 were harvested at 30 DAS (before the onset of water deficit) and divided to root and aerial parts, which were dried in a convection oven (60°C) to reach a constant weight for the determination of the initial dry plant biomass (W<sub>1</sub>).

The other two subsets were used as control treatments (C, well-irrigated conditions) or drought stressed (DS) treatments. Before the onset of stress (30 DAS), the pots of both of the treatments were saturated with water and kept overnight to drain the excess of water from the following morning, the pots were placed inside plastic bags to prevent the loss of water by soil evaporation. From that point, irrigation was suspended in the pots of the DS treatment. The pots were then

weighed daily between 09:00 h and 10:00 h to maintain the weight of the pots at 70% of the pot weight after saturation (C) or 20-40% of the pot weight after saturation (DS). To maintain these levels, water was added to the pots when necessary. The water deficit started at 30 DAS and lasted for 18 days. Samples were taken at 10 (40% FC) and 17 (20% FC) days after water stress (DAWS).

### 5.3.3 Analysis of growth

Measurements were performed at 17 DAWS to analyze growth. The measurements consisted of analyses of the leaf area (length x width), plant height (cm), number of leaves, and number of nodes. At the end of the experiment, the plants were collected and divided into root and aerial parts to determine the final dry plant biomass ( $W_2$ ) by drying in an oven until a constant weight was reached.

The following equation was used to calculate the relative growth rate (RGR) ( $\text{g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ), where  $t_2 - t_1$  is the time interval of stress:

$$\text{RGR} = (\text{Ln } W_2 - \text{Ln } W_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

The percentage of reduction in growth (RG%) was calculated using equation 2, where DMGC is the dry-matter gain (g) of the control plants, and DMGS is the dry-matter gain (g) of the plants under water deficit (s).

$$\text{RG\%} = (\text{DMGC} - \text{DMGS}) * 100 / \text{DMGC} \quad (2)$$

### 5.3.4 Gas exchanges

Photosynthesis ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ) and internal  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i$ ) were analyzed at 10 and 17 DAWS using Li-6400 equipment with a light source (90% red + 10% blue) and a  $2\text{-cm}^2$  chamber under the following chamber conditions:  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation; flow rate,  $400 \mu\text{mol s}^{-1}$ ; sample  $\text{CO}_2$ ,  $390 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ; VPD, 3.53 kPa; leaf temperature,  $31.3 \pm 1.6^\circ\text{C}$ . This measurement was performed in the central leaflet of the third (terceiro) fully expanded trefoil (Rodrigues et al., 2012). The intrinsic water-use efficiency (WUE) was calculated as the ratio between  $A$  and  $g_s$  (Gilbert et al., 2011).

### **5.3.5 Water and osmotic potentials, electrolyte leakage, relative water content and leaf succulence**

Water potential was determined using a PsyPro psychrometer (Model PST-55-SF, Wescor, Inc., Logan, UT) according to Nepomuceno et al. (1998). The electrolyte leakage was analyzed according to Blum & Ebercon (1981). Leaf succulence was determined according to Jennings (1976), and the relative water content (RWC) was analyzed according to Barrs (1968). The measurements were performed at 10 and 17 DAWS.

### **5.3.6 Analysis of agronomic characteristics in field conditions**

The agronomic assessment of the cultivars and line D2A was performed on Embrapa Soybean (Londrina – state of Paraná, Brazil) during the 2011/2012 crop season in an experiment with randomized blocks with split-plots and four replicates.

Temperature and rainfall were monitored at the meteorological station installed on the farm. With data obtained from the meteorological station, Crusiol et al. (2012) calculated the water balance according to Thornthwaite & Mather (1955).

During the experiment, the plants were subjected to four water regimes: I (irrigated, matric potential between – 0.03 and – 0.05 Mpa), NI (natural conditions), VS (water stress in the vegetative growth stage), and RS (water stress in the reproductive stage). The stresses in the vegetative and reproductive growth stages were applied artificially using a rain out shelter programmed to close automatically at the first occurrence of rain, in the vegetative or reproductive stress treatments, and open when the rain ended. In the shelter, the humidity was monitored daily by tensiometers at 30-cm depth and weekly using gravimetric methods.

The following growth parameters were assessed in the agronomic experiment: leaf area, leaf-area index (LAI, calculated as the ratio between the leaf area and unit of area occupied in the soil by the plant) both in the R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub> stage, shoot dry and fresh matter (SDW and SFW), and the height (H) and number of nodes (NN) in stage R<sub>8</sub>. The tested productivity parameters were the total number of pods (NP), number of seeds (NS), apparent harvest index (AHI), dry matter of 100 seeds (DM100S) and yield in stage R<sub>8</sub>. The yield was calculated (at 13% humidity) using the following equation: Yield (Kg/ha) = (100 – grain moisture at harvest, %) x (grain weight at

harvest, Kg x 10000) / harvest area, m<sup>2</sup>).

### **5.3.7 Experimental design and statistical analysis**

The experimental design of the greenhouse experiment included randomized blocks in a factorial arrangement (3x2) with six replicates. The factors considered were a) genotypes: BR16 cultivar, Embrapa 48 cultivar, and D2A line; and b) water availability: control (70% FC) and water stressed (40% or 20% of FC).

The experimental design of the field conditions was randomized blocks arranged in split-plots with four replicates. The main plot corresponded to the water regimes (NI, I, VS, and RS), and the subplot was composed of the soybean cultivars (BR 16 and Embrapa 48) and the D2A line.

The results obtained from the greenhouse and field conditions experiments were subjected to the Duncan's test at 5% significance using the SASM Agri software (Canteri et al., 2001).

## **5.4 SUPPLEMENTAL DATA**

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Vapour Pressure Deficit (kPa) of the greenhouse experiment. DAS means days after sowing and DAWS means days after water deficit.

## **5.5 RESULTS**

### **5.5.1 Experiment in greenhouse**

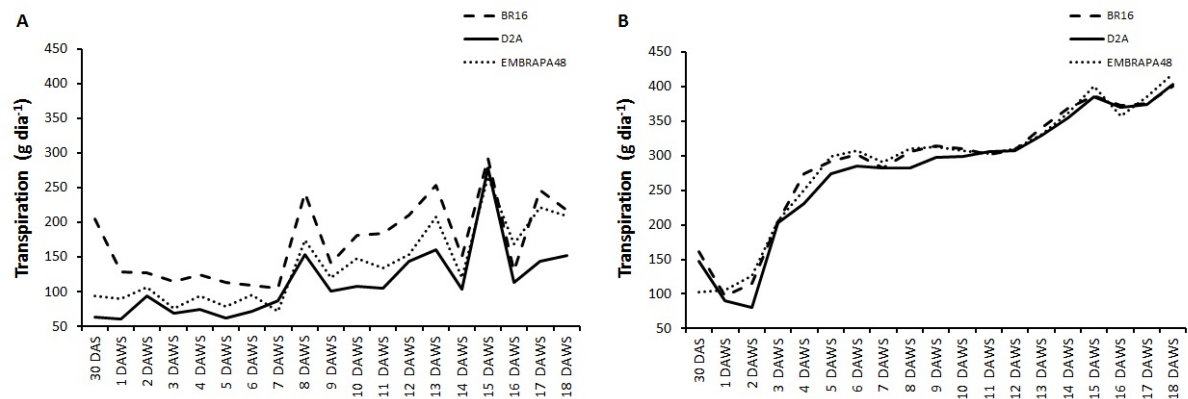
In our study, the phenotype and the development of symptoms of water deficit were studied in conventional cultivars with different responses to drought and in a line genetically modified (GM) for drought tolerance. Symptoms of wilting were observed at 17 DAWS in plants of the BR 16 cultivar (drought-sensitive) and D2A (GM) (Figures 1A, 1B and 5), which displayed leaf water potential and RWC of -2.54

MPa and 71% and -2.06 MPa and 65%, respectively. No signs of water deficit were observed in Embrapa 48 plants after they reached values of water potential and RWC of -4.21 MPa and 57% (Figure 1C and 5) at 17 DAWS.



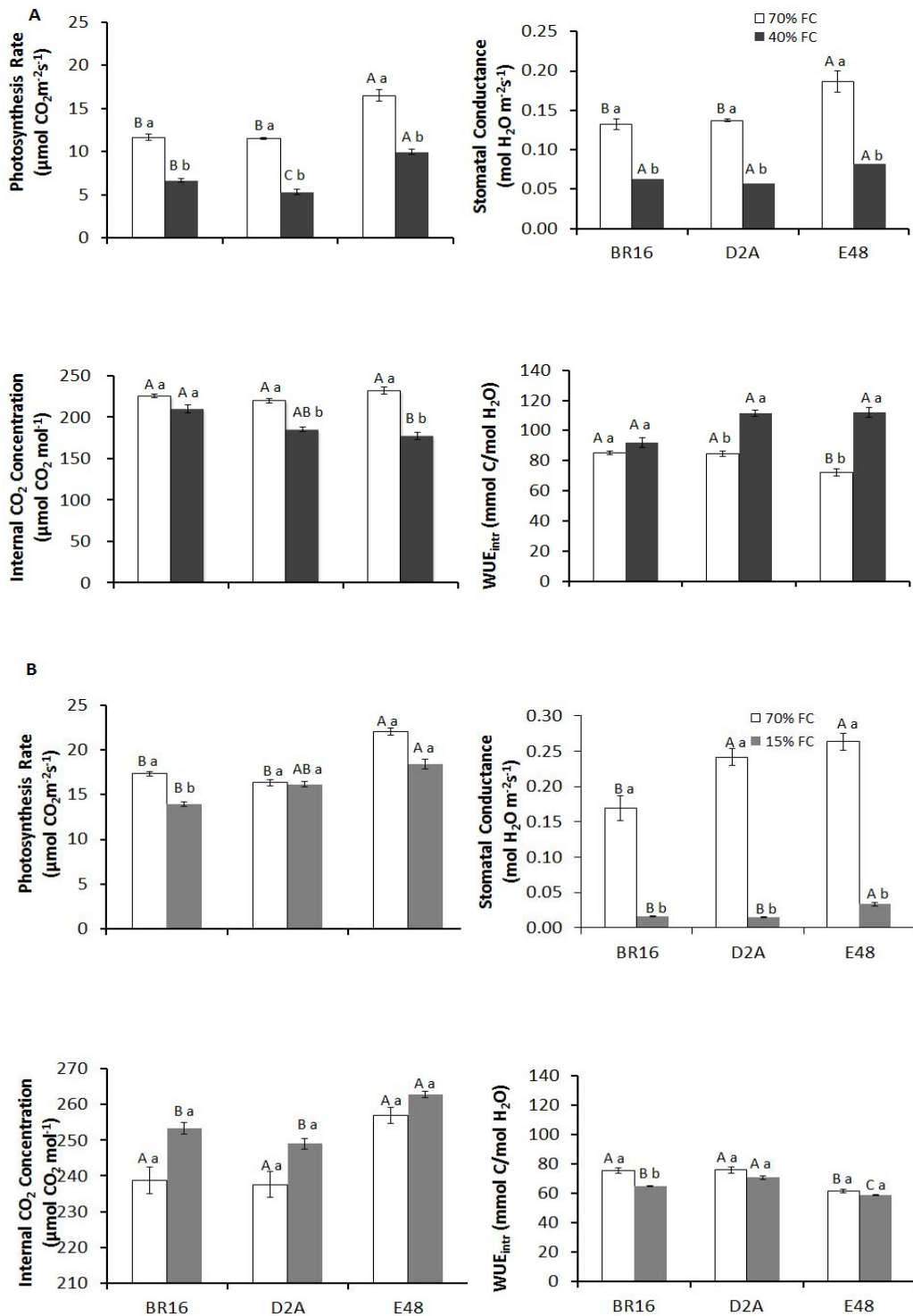
**Figure 1.** BR 16 (A), D2A (B) and Embrapa 48 (C) plants in the V<sub>7</sub>-V<sub>8</sub> stage under control conditions (left) and drought stress conditions at 17 DAWS (right).

Analyses of the water loss by the plants through transpiration showed that in the control situation, Embrapa 48 cultivar plants had lower transpiration than the BR 16 cultivar at 30 DAS, 3, 4, 5, 8, and 10 to 13 DAWS (Figure 2). The reductions in transpiration in this condition varied from 18.04% to 54.34% and occurred both on days of high (**2.4kPa/30 DAS** and **2.9kPa/8 DAWS**) and low (**0.7kPa/12 DAWS**) VPD (Supplementary Figure S1). Further, D2A plants also transpired less than the BR 16 cultivar (12.84% to 68.7%) with the exception of 1, 2, 7, and 15 DAWS. When compared to Embrapa 48 cultivar plants, the reductions in the transpiration of D2A plants were lower, 20.83% to 35.21%. Under drought conditions, a reduction in transpiration compared to the BR 16 cultivar was observed only on days 2 and 5 DAWS for the D2A plants (Figure 2). Such transpiration behavior suggests that Embrapa 48 cultivar plants and D2A line exhibit conservative water use (low transpiration) under good conditions of water availability, which promotes the storage of water in the soil for later use.



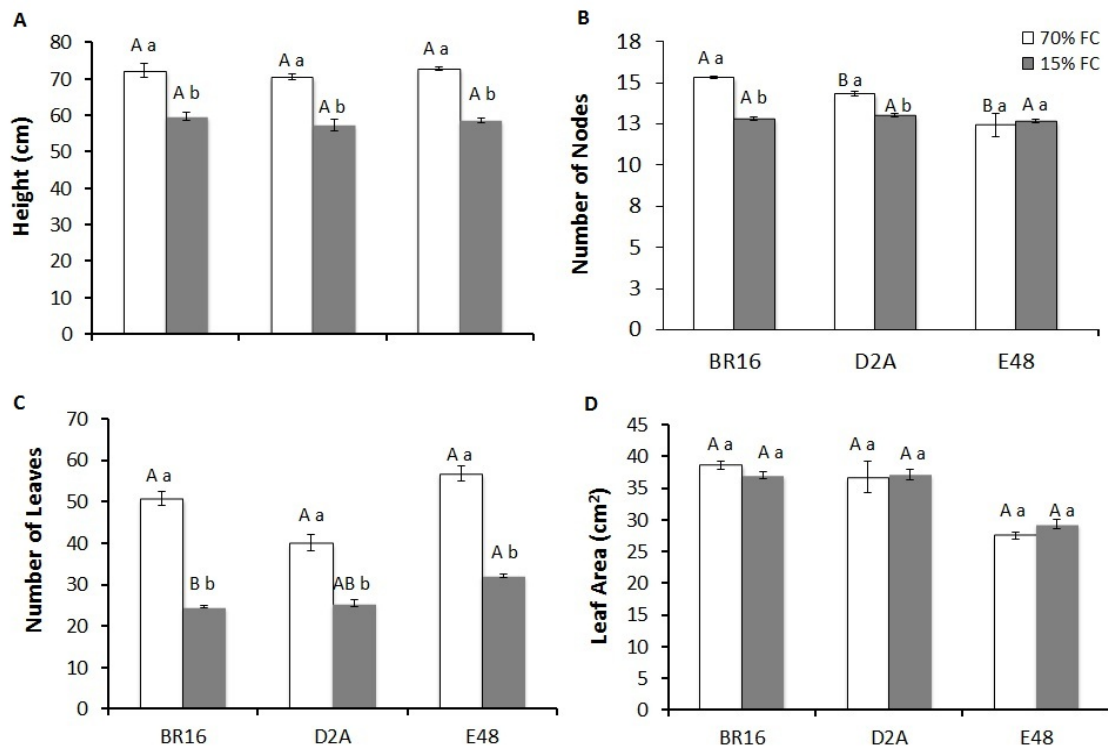
**Figure 2.** Transpiration ( $\text{g day}^{-1}$ ) of BR16, Embrapa 48 and D2A plants under well-irrigated or drought stressed conditions ( $p < 0,05$ ;  $n = 4 \pm$  standard error of the mean). (A) Control plants and, (B) Treated plants. DAS means days after sowing and DAWS means days after water stress.

In physiological terms, the main determining factors of water loss in plants are stomatal conductance ( $g_s$ ) and leaf area. Therefore, the gas exchanges and growth of different genotypes were analyzed. The control plants of BR 16 cultivar presented lower  $g_s$  than the Embrapa 48 cultivar at 10 and 17 DAWS and in comparison to the D2A plants at 17 DAS (Figure 3). Plants of BR16 and D2A showed a similar photosynthesis (A) on both dates sampled, lower than that of the Embrapa 48 cultivar. The greatest  $g_s$  of the Embrapa 48 cultivar resulted in lower WUE for this cultivar because stomatal conductance decreased faster than photosynthetic uptake of carbon. Under drought conditions, at 10 DAWS, the  $g_s$  of the different genotypes were similar, while at 17 DAWS, the  $g_s$  were greater for the Embrapa 48 plants. The A of the plants followed the order  $D2A < BR\ 16 < Embrapa\ 48$  at 10 DAWS, but was similar at 17 DAWS. The WUE of the BR 16, D2A, and Embrapa 48 plants were similar at 10 DAWS. However, at 17 DAWS, the WUE of the BR 16 plants was lower than that of D2A and greater than that of Embrapa 48 (Figure 3).



**Figure 3.** Gas Exchange of BR16, Embrapa 48 and D2A plants ( $n = 6 \pm$  standard error of mean) analyzed at 17 DAWs in (A) and 10 DAWs in (B). Same uppercase letters (comparison between cultivars under control or drought stressed conditions) and lowercase letters (comparison between control and drought stressed conditions within a given cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ).

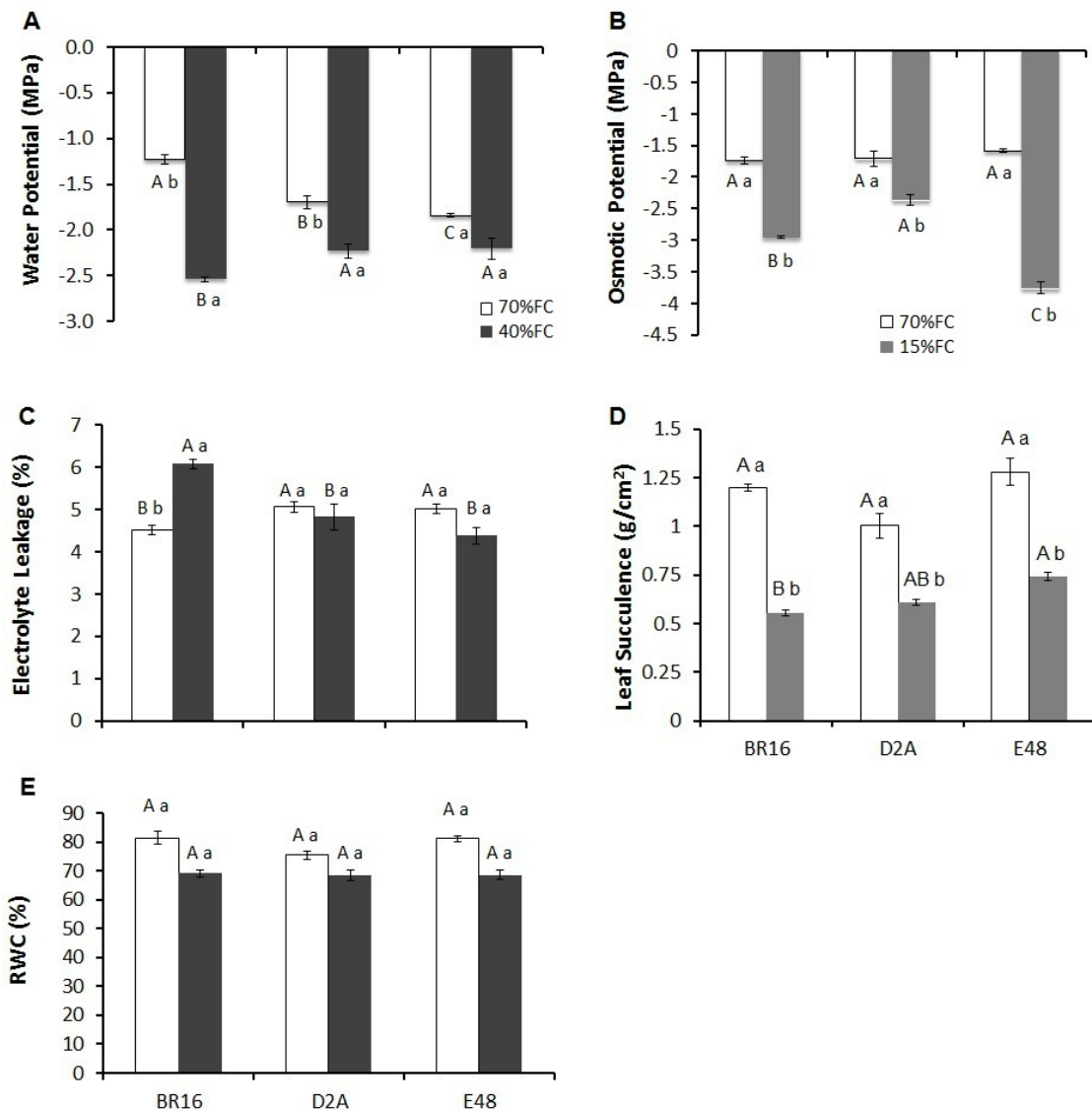
The analyses of growth showed that the BR 16 and Embrapa 48 cultivars and D2A plants displayed similar growth patterns under conditions of good water availability, with statistically significant differences observed only for the greater number of nodes in the BR16 cultivar (Figure 4). Although not statistically significant, reduced leaf area and a lower number of leaves were observed for the Embrapa 48 cultivar. Under drought conditions, the BR16 cultivar exhibited 3.5% and 23.5% fewer leaves than the D2A line and Embrapa 48 cultivar, respectively. These data indicate that these genotypes had continued growth under water deficit (Figure 4). Regarding the data for growth and gas exchanges, differences in the onset of wilt symptoms between the BR 16 and Embrapa 48 cultivars or similarities in symptoms between BR 16 and D2A could not be totally explained by differences in plant size or stomatal conductance.



**Figure 4.** Analysis of soybean plant growth at 17 DAWs. (A) Height (cm); (B) Number of Nodes; (C) Number of Leaves; (D) Leaf Area (cm<sup>2</sup>). Same uppercase letters (comparison between genotypes within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0.05$ ;  $n = 6 \pm$  standard error of the mean).

Analyzing the leaf water potential of plants, those of the BR 16 cultivar in the control situation displayed greater water potential than the other genotypes. However, under drought condition, the D2A and Embrapa 48 plants had greater water potential than the BR 16 cultivar. Comparing the differences in leaf water potential in different genotypes under the control conditions and under water deficit, BR 16 and D2A plants showed reductions in their leaf water potentials of approximately 110 and 31%, respectively. With respect to Embrapa 48 cultivar, no significant differences were observed in the leaf water potential of plants in the control situation and under water deficit (Figure 5A), which indicates the maintenance of water status under water deficit. The leaf succulence at 17 DAWs did not significantly differ between the different genotypes. However, greater succulence was observed for the Embrapa 48 cultivar under drought stressed (Figure 5D). The data above appear to indicate that the greater succulence and water potential of the D2A and Embrapa 48 plants under water deficit resulted from the preservation of water in the substrate containing these plants by means of their lower transpiration rates in the control situation. Regarding electrolyte leakage, in the control situation, the D2A and Embrapa 48 plants suffered higher electrolyte loss due to the damages caused to membranes than the BR 16 cultivar, whereas under water deficit conditions at 17 DAWs, greater leakage occurred for the BR 16 cultivar (Figure 5C).

An intriguing fact was that although the evidence indicates that D2A and Embrapa 48 plants conserve water in the soil for later use, wilt symptoms were not prevented in D2A plants (Figure 1), on the contrary, were similar to those of the BR 16 cultivar plants, which are drought-sensitive (Figure 1). The differences found between the Embrapa 48 and D2A plants were related to osmotic potential, which was less for the plants of the Embrapa 48 cultivar compared to the BR 16 and D2A plants under water deficit (17 DAWs) (Figure 5B). Although the chemical nature of the solutes involved in lowering the osmotic potential is unknown, it is possible that these solutes act in processes related to the osmotic adjustment or protection of cell structures in situations of more prolonged stress.

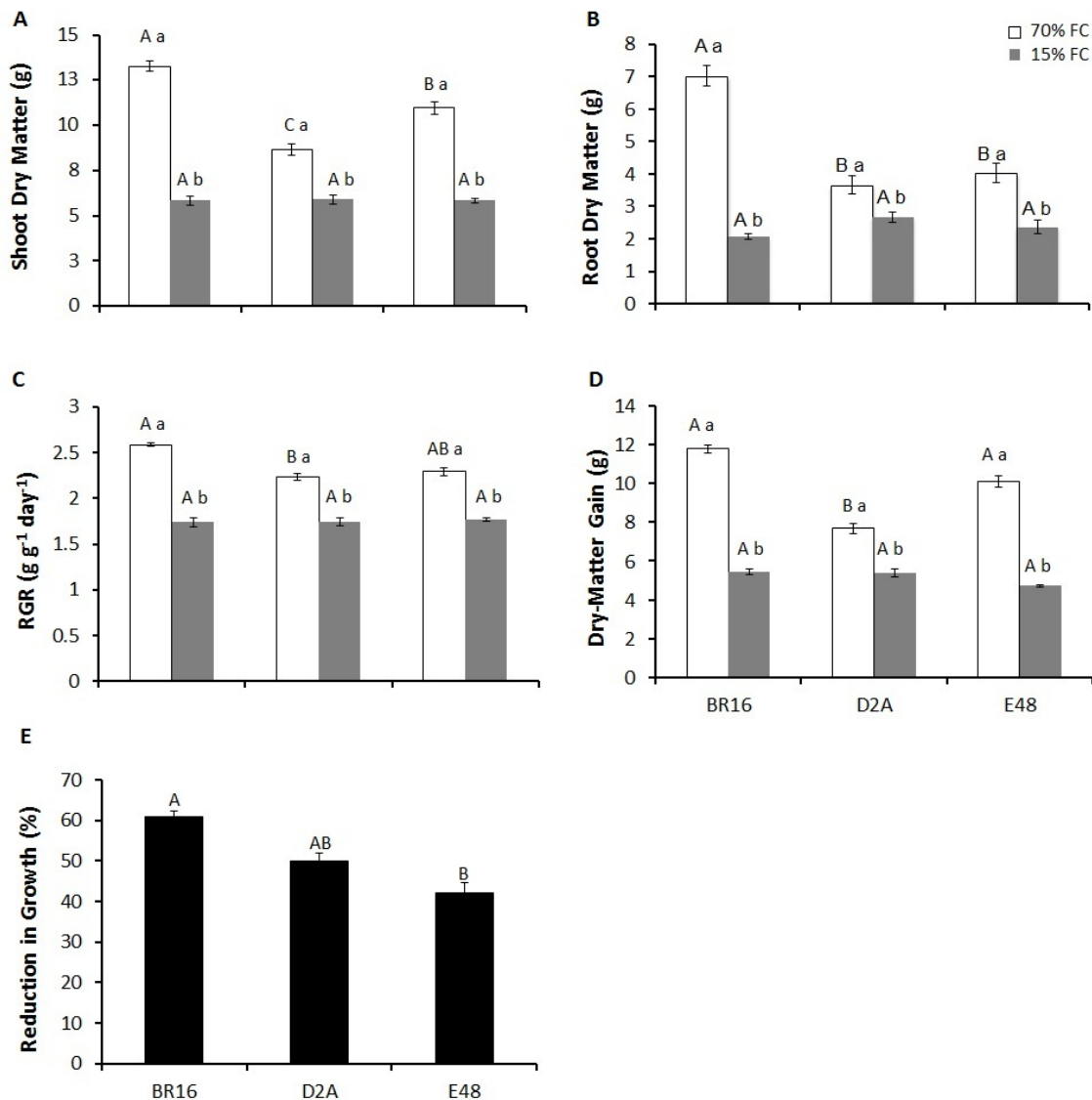


**Figure 5.** (A) Water potential; (C) Electrolyte Leakage and (E) RWC analyzed at 10 DAWs and (B) Osmotic Potential and (D) Leaf Succulence analyzed at 17 DAWs.

Same uppercase letters (comparison between cultivars within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ;  $n = 6 \pm$  standard error of the mean).

It was also confirmed that under conditions of good water availability, the BR 16 cultivar had greater values of dry matter of roots and aerial parts (Figure 6A and 6B) and higher RGR (Figure 6C) than the other genotypes. These data, together with the greater values of DMG (Figure 6D) for the BR16 cultivar compared to D2A, indicate that greater values of transpiration in this cultivar contribute to the increase in

leaf and root dry matter. The percentage reduction in the growth of plants under water deficit compared to plants under good water availability was smaller for the Embrapa 48 cultivar, which could also be confirmed visually (Figure 1). The plants of the BR 16 cultivar showed reductions in growth of 21.78% and 44.73% greater compared to the D2A and Embrapa 48 plants, respectively (Figure 6E).

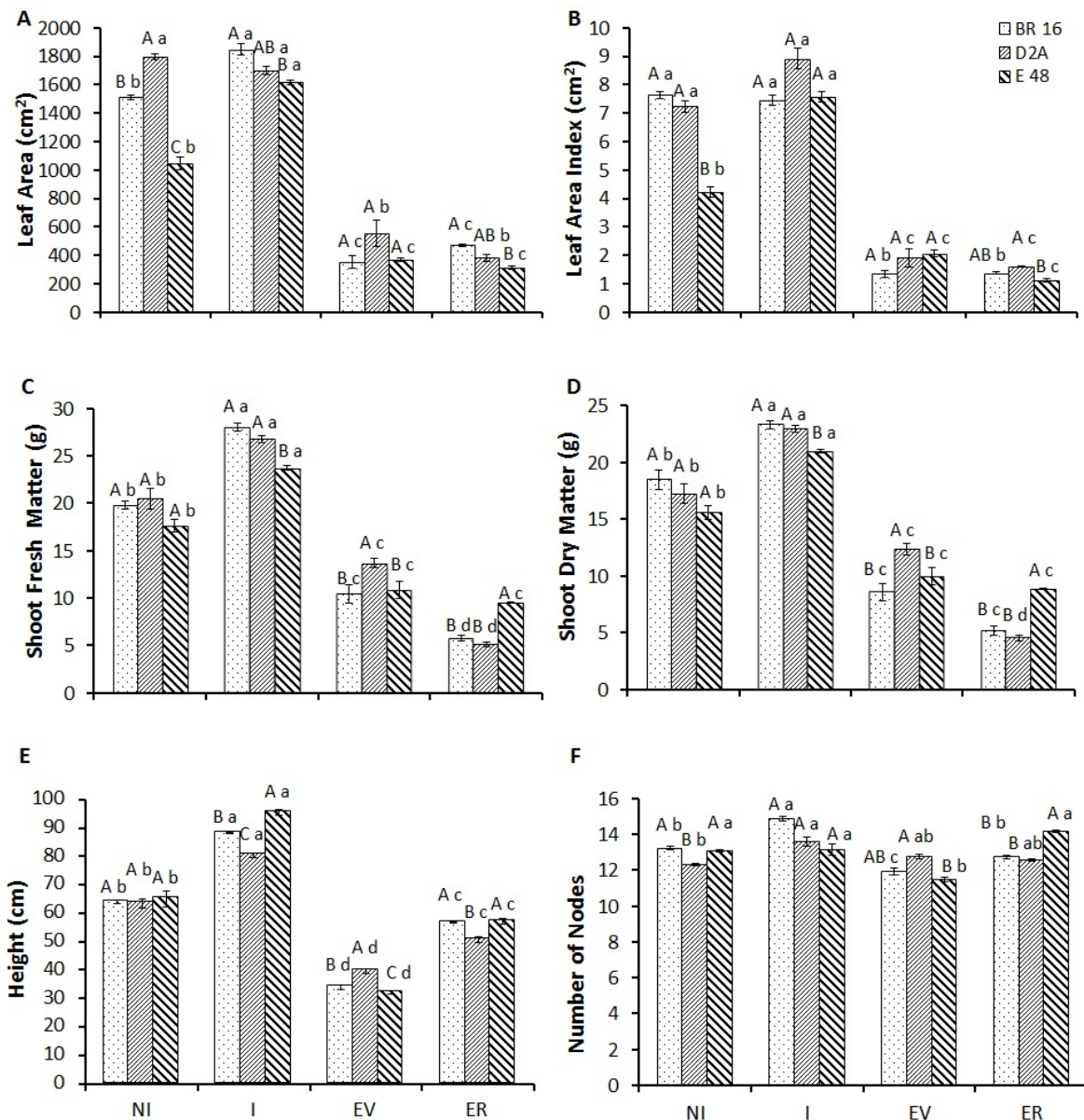


**Figure 6.** Growth characteristics of soybean plants ( $n = 6 \pm$  standard error of the mean). (A) Shoot Dry Matter (g); (B) Root Dry Matter (g); (C) Relative Growth Rate ( $\text{g g}^{-1} \text{day}^{-1}$ ); (D) Dry-Matter Gain (g); (E) Reduction in Growth (%). Same uppercase letters (comparison between cultivars within control or drought stress) and lowercase letters (comparison between control and drought stress within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ).

### **5.5.2 Experiment in field conditions**

Studies with GM plants are frequently conducted with plants in the vegetative stage and in greenhouse conditions. However, considering that weather along with the duration and intensity of drought in each developmental stage of the crop are key determinants of productivity, experiments in real field conditions become crucial in studies aiming to obtain materials that are more tolerant of abiotic stresses. D2A plants as well as those of the BR 16 and Embrapa 48 cultivars were tested in field conditions during the 2011/2012 crop season, when the occurrence of water deficit was confirmed in various developmental stages of the crop, including pod filling (Crusiol et al., 2012). The performance of the plants in the field was also studied when water deficit was applied in the vegetative or reproductive stages using rain out shelters.

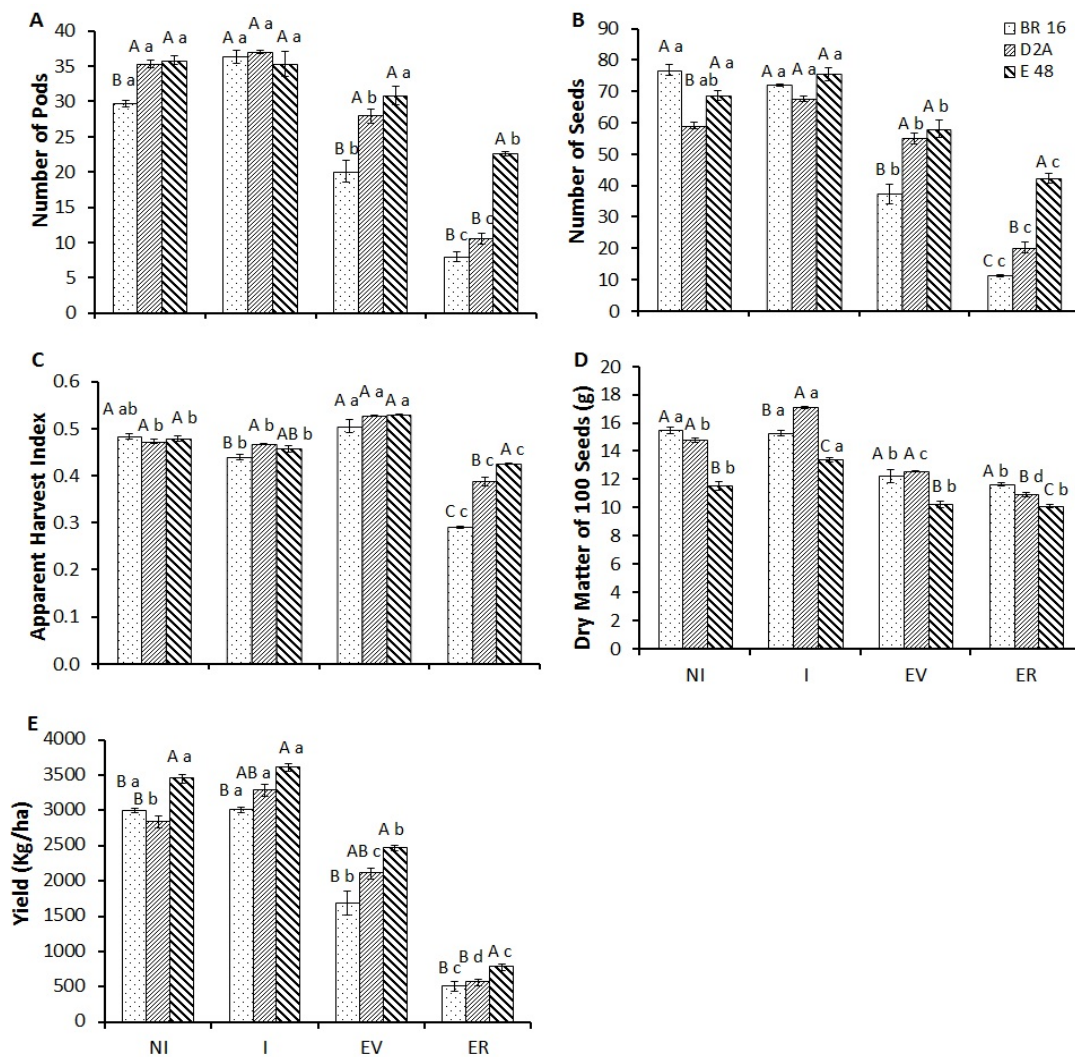
Under natural conditions (NI), the Embrapa 48 cultivar exhibited smaller leaf area and LAI than the other genotypes, while D2A had a lower number of nodes. When stress was applied in the vegetative stage, D2A had greater SFW, SDW, and height. However, the number of nodes was similar to that of the BR16 cultivar. Under water stress in the reproductive stage, Embrapa 48 plants had greater SFW, SDW, and number of nodes than the other genotypes, although the Embrapa 48 plants had lower leaf area and LAI (Figure 7). In conditions of good water availability, the main differences in growth occurred for Embrapa 48, which exhibited lower leaf area, SFW, and SDW and greater height than the other genotypes (Figure 7).



**Figure 7.** Growth parameters in BR 16, Embrapa 48 and D2A plants. Parameters (A) (Leaf Area, cm<sup>2</sup>) and (B) (Leaf Area Index, cm<sup>2</sup>) were analyzed in plants in the R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub> stage, and (C) (Shoot Fresh Matter, g), (D) (Shoot Dry Matter, g) (E) (Height, cm) and (F) (Number of Nodes) were analyzed at harvest, stage R<sub>8</sub>. NI, I, VS and RS mean natural conditions, irrigated, water stress applied in the vegetative stress and under reproductive stress, respectively. Same uppercase letters (comparison between the cultivars within a water regime) and lowercase letters (comparison between the water regimes within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ).

Regarding yield, the Embrapa 48 cultivar had greater productivity in all the tested water regimes. While the yields of the D2A plants were similar to those of the BR 16 cultivar, the GM material overcame its non-modified parental line with respect

to number of pods (NP) (NI and VS), number of seeds (NS) (VS and RS), apparent harvest index (AHI) (I and RS), and dry matter of 100 seeds (DM100S) (I). Although the NS and DM100S of D2A plants was smaller than that of BR 16 plants in NI and RS respectively, the NS of D2A plants was greater in the RS (Figure 8). Greater reductions in yield occurred when water deficit was applied in the reproductive stage, with values of 83, 78, and 83% for the BR 16 plants, Embrapa 48, and D2A, respectively.



**Figure 8.** Productivity parameters analyzed at harvest, stage R<sub>8</sub>, of BR 16, Embrapa 48 and D2A plants. NI, I, VS and RS mean natural conditions, irrigated, water stress applied in the vegetative stress and under reproductive stress, respectively. (A) Number of Pods; (B) Number of Seeds; (C) Apparent Harvest Index; (D) Dry Matter of 100 Seeds (g); (E) Yield (Kg/ha). Same uppercase letters (comparison between

the cultivars within a water regime) and lowercase letters (comparison between the water regimes within a cultivar) indicate that there was no significant difference ( $p < 0,05$ ).

## 5.6 DISCUSSION

### 5.6.1 Experiment in greenhouse

Reduction in the leaf water status is known to trigger the appearance of symptoms of water deficit, such as wilting and reductions of growth, photosynthesis, and the fluorescence of chlorophyll *a* (Wang et al., 2008; Woo et al., 2008).

The reductions in water potential ( $\psi_P$ ), relative water content (RWC), and leaf *g*s occur as plants deplete water from the substrate in which they are being grown. However, for some cultivars/GM materials, a delay in the appearance of stress symptoms compared to their controls when these materials are subjected to water deficit is observed.

According to Lawlor (2013), delays in the appearance of stress symptoms could be caused by differences in the rate of water loss by transpiration as a consequence of the lower *g*s or leaf area of plant materials that exhibit delayed onset of stress. However, in material genetically modified for drought tolerance, differences in water-stress symptoms could also be caused by the activation of drought-responsive genes.

In our studies, a delay in the appearance of wilting or other water-stress symptoms was observed for the plant materials in study under greenhouse conditions. Thus, this study aimed to shed light on whether the differences observed were consequences of delayed stress onset or, in the case of the GM material D2A, of the possible activation of drought-response genes.

Keeping in mind that the success of any development strategy of GM plants and of conventional cultivars for drought tolerance is determined by the final productivity under field conditions, the characteristics of growth and yield of different genotypes in real field conditions and when water stress was applied in the vegetative and reproductive periods were evaluated.

After imposing a drought condition in the greenhouse, the Embrapa 48 plants developed stress symptoms more slowly than the BR 16 cultivar. However, for the

D2A plants, the onset of the emergence of water stress symptoms was similar to that of the BR16 cultivar.

The transpiration of the genotypes studied was assessed by weighing the pots daily. Under conditions of good water availability, the plants of the Embrapa 48 and D2A genotypes had reduced transpiration and, therefore, less removal and more conservation of water in the substrate relative to the BR16 cultivar (Figure 2). It is interesting to note that the D2A plants, although exhibiting characteristics related to less water extraction from the soil (lower transpiration), showed similar wilting to that of the BR 16 cultivar.

As stated above, in physiological terms, the main factors determining the water loss in plants are leaf area and  $g_s$  (Katul et al., 2010). However, in plants growing in pots, where water is rapidly depleted from the substrate, the regulation of the water balance in plants is generally determined by  $g_s$  and to a lesser degree by the reduction in leaf area (Passioura, 2006).

Data for gas exchanges obtained in this experiment demonstrate that the limitations in transpiration of the Embrapa 48 and D2A plants under good water availability could not be attributed to a lower  $g_s$  because these genotypes exhibited greater  $g_s$  in the control situation (Figure 3).

These data contrast with reports that, in several genetically modified plants,  $g_s$  is often reduced (Belin et al., 2010) due to changes in the structure and function of stomata (Cui et al., 2008; Gao et al., 2011). According to Lawlor (2013), the transformation in some cases alters the size of stomata, stomata density (stomata/unit of leaf area), and stomatal index (stomata/epidermal cell).

The differences in the reductions in leaf area were not statistically significant in the material studied (Figure 4), although it is possible that small decreases in the leaf area of GM plants, which did not reach statistical significance, could accumulate throughout several days, contributing, at least in part, to a greater total water loss (Lawlor 2013).

A more likely explanation for the lower transpiration rates in the Embrapa 48 and D2A plants compared to the BR 16 cultivar could be related to a greater mesophyll resistance to the exit of water vapor from the leaves of BR16 plants under conditions of good water availability. These data are corroborated by Polizel et al. (2011), who observed that plants of the BR 16 cultivar in the R<sub>4</sub> stage showed 56%

greater leaf thickness than plants containing the *rd29A:DREB1A* construction in the control situation. It may be possible that differences in leaf thickness of BR 16 plants have resulted from differences in the paraveinal mesophyll, a set of cells with horizontal orientation if compared to the other cells of the mesophyll, whose function would be to facilitate the horizontal translocation of the products of photosynthesis (Fisher, 1967). Such differences could also be the result of the presence of greater intercellular spaces, with a consequent reduction in mesophyll resistance. Anatomical and/or physiological studies of leaves of D2A and Embrapa 48 plants are therefore needed to determine differences in mesophyll resistance.

The cells of the leaf tissue can maintain homeostasis and water status under conditions of water deficit. Previous studies of microarray analysis of 35S:*AtDREB2A* CA in transgenic plants of *A. thaliana* performed by Sakuma et al. (2006b) showed overexpression of genes as *LEAs* (Late Embriogenesis), dehydrins, *XERO2*, *COR15A*, *RD17*, genes of hydrophilic proteins associated with membranes. The precise function of dehydrins has not been established yet, but *in vitro* experiments revealed that some dehydrins (YSK(n)-type) bind to lipid vesicles that contain acidic phospholipids, and others (K(n)S) were shown to bind metals and have the ability to scavenge hydroxyl radicals (Asghar et al., 1994), protect lipid membranes against peroxidation or display cryoprotective activity towards freezing-sensitive enzymes (Rorat, 2006). Evidence suggests that the aquaporins, membrane channel proteins, play a role in maintenance of homeostasis and water status (Tyerman et al., 2002; Galmés et al., 2007). Analysis of the genes that express aquaporins in the materials studied could contribute to understanding the observed differences.

The analysis of electrolyte leakage in the different genotypes revealed less leakage for the Embrapa 48 and D2A cultivars in the initial periods of water deficit (Figure 5C), most likely as a result of the lesser damages caused to the cell membranes as a consequence of the better water status of these genotypes at the onset of water deficit.

The reduction in electrolyte leakage in DREB transgenic plants could also have occurred because of the transcription and translation of proteins that confer protection to cell structures and the production of other molecules such as osmoprotectants (Nakashima et al., 2009). Several studies (Chen et al., 2007; Cong et al. 2008; Ito et al., 2006) have demonstrated that DREB transgenic plants

accumulate greater levels of proline, thus providing protection from macromolecules and ROS detoxification, and other soluble sugars that are fundamental for osmotic adjustment than non-transgenic plants.

In transgenic plants 35S:DREB2A CA of *A. thaliana*, Sakuma et al. (2006 a,b) identified overexpression of genes of sugar metabolism such as *AtGo/S3* putative galactinol synthase, glycosyltransferase family, glycosyl hydrolase family 17 and *AtGo/S1* putative galactinol synthase. The first step in the biosynthesis pathway of raffinose family oligosaccharides (RFOs) is catalyzed by the enzyme galactinol synthase that act as a regulator of carbon partitioning (sucrose – RFOs) (Saravitz et al., 1987). In abiotic stress, the RFOs plays role in protection by acting as a compatible solute (Zhou et al., 2012). Thus, a detailed analysis of the targets of DREB2A should be done in transgenic soybean to confirm the overexpression of genes including those related to sugar metabolism and protection of membrane.

Differences in *A* between the different genotypes were found in the control situation and under water deficit between BR 16/D2A and Embrapa 48 (Figure 3). Greater *A* was observed for the Embrapa 48 cultivar, which could be attributed to a greater *gs*. Farias et al. (1999) found that the Embrapa 48 cultivar was one of those studied with the lowest reduction of the photosynthetic rate under water deficit and that after the end of water deficiency, this cultivar maintained the highest values for photosynthetic rate.

The analysis of the water status of the plants revealed that the BR 16 cultivar had greater water potential (Figure 5A) than the other genotypes in the control condition. However, under drought stressed, the genotypes Embrapa 48 and D2A reached greater potentials (Figure 5A) and leaf succulence (Figure 5D), most likely as a result of the lower water use when under control conditions and greater absorption of water stored in the substrate when under drought condition. Maintenance of high leaf water potential under water deficit is associated with the dehydration-avoidance mechanism (Blum, 1988; Ludlow & Muchow, 1990; Guan et al., 2010).

For the Embrapa 48 genotype, at the end of the stress period, a reduction in osmotic potential was still observed (Figure 5B) compared to the other cultivars. This reduction was likely caused by the increase in the concentration of solutes. James et al. (2008) suggested that genotypes with lower osmotic potentials exhibit lower rates

of decline of relative water content, indicating the capacity to maintain turgor for longer. With the maintenance of turgor, root systems can grow relatively more than leaves, increasing the water supply.

The dry matter of roots and aerial parts was greater for the BR 16 cultivar in the control situation. However, no difference was observed among the genotypes studied under drought. In conditions of water deficit, BR 16 plants had a smaller number of leaves than the other genotypes (Figure 4C). Thus, water conserved in the substrate of plants of the genotypes Embrapa 48 and D2A was likely later used in the production of new leaves and roots under water-deficit conditions, which contributed to the equality of the dry matter level between the genotypes. Another indication of this fact was the lower percentage reduction of growth in these two genotypes relative to BR 16 when the accumulation of dry matter (Figure 6E) under water deficit was compared with the control situation.

The reduction in osmotic potential (Figure 5B) at the end of the stress period may have contributed to the maintenance of water absorption from the soil and the protection of the cell structures in the Embrapa 48 cultivar. Meanwhile, it is necessary to identify the chemical nature of the compounds responsible for the reduction of the osmotic potential and the possible roles of this reduction in tolerance to water deficit. Such mechanisms may have been fundamental for the delay in the appearance of wilt symptoms in this cultivar compared to the other genotypes (Figure 1).

As discussed above, an unexpected fact was that in the D2A plants, the appearance of symptoms of wilting occurred at the same time as in the BR 16 cultivar. This observation indicates that a lower rate of water loss under conditions of good water availability was not sufficient to delay the emergence of symptoms of wilting. Moreover, it is very likely that protection mechanisms of cell structures under drought also need to be triggered for a delay in the emergence of symptoms to occur, as suggested for the Embrapa 48 cultivar.

In accordance with the preceding discussion, it can be suggested that D2A and Embrapa 48 plants exhibit physiological characteristics related to the mechanism of drought avoidance because they display lower transpiration rates under conditions of good water availability, which results in the conservation of water in the soil (Kholová et al., 2010 and Zaman-Allah et al., 2011).

Certain genotypes are known to be capable of maintaining good transpiration

rates until the soil becomes quite dry, while in others, a decline in transpiration occurs when the soil is still relatively moist. This variation was confirmed for maize (Ray & Sinclair, 1997; Schmidt et al., 2011), soybean (Vadez & Sinclair, 2001; Hufstetler et al., 2007), and peanut (Bhatnagar-Mathur et al., 2007).

According to Tuberosa (2012), such a mechanism could be considered advantageous in the case of a long period of drought because it allows the conservation of water in the soil for use in later stages. Conversely, this characteristic would not be advantageous in conditions of short dry periods because it would entail a reduction in light uptake and carbon fixation, causing losses in production or reduction of growth.

### **5.6.2 Experiment in field conditions**

In field conditions, plants of the Embrapa 48 cultivar were capable of promoting greater adjustments in their growth under the different water regimes, and such adjustments in the growth components contributed to the greater yields achieved by this cultivar under conditions of drought and of good water availability (Figure 7 and 8).

Lemos et al. (2011) studied the agronomic performance of 17 soybean cultivars in the 2002/03, 2003/04, and 2004/05 crop season and observed that the Embrapa 48 cultivar showed high productivity, being in the most productive group in two of the three seasons studied (2002/03 and 2003/04) and in the second group in the 2004/05 crop season, despite being in the last groups for the characteristic of the mass of 100 grains. Regarding the number of seeds per pod, Lemos et al. (2011) observed that the Embrapa 48 cultivar behaved in two ways: in the 2003/04 season, this cultivar was in the best group, and in the 2002/03 and 2004/05 seasons, it was in the last group. These data indicate that the 100-grain mass did not affect the productivity of the Embrapa 48 cultivar, as observed in the present study, in which this cultivar showed increased yield and a greater number of seeds despite displaying a lower 100-grain mass.

Although the yields of the D2A plants were similar to those of the BR 16 cultivar, the GM material surpassed its non-transformed parental material with respect to NP (NI and VS), NS (VS and RS), AHI (I and RS), and DM100S (I).

However, the NS of the D2A plants was less than that of the BR 16 plants in NI and DM100S in RS (Figure 8). Although the differences were not reflected in the yield in a statistically significant way, increases of 25.17% in the yield of the D2A line were observed compared to the BR 16 cultivar when stress was applied in the vegetative stage.

In studies performed by Fuganti-Pagliarini et al. (2011), the productivity of the D2A line did not differ from that of the BR 16 or Embrapa 48 cultivars, which was attributed to the non-occurrence of severe deficits during the crop season 2010/1011 of soybean studied.

In this study, which corresponds to the 2011/2012 crop season, evapotranspiration exceeded rainfall during the various crop stages (Crusiol et al., 2012), which characterized the occurrence of natural drought during this season, contributing to the differences observed compared to the studies of Fuganti-Pagliarini et al. (2011).

It was thus concluded that the differences in water-stress symptoms between BR 16 and Embrapa 48 under greenhouse conditions were explained by a delayed stress onset because the Embrapa 48 plants displayed characteristics related to water conservation in the soil (less transpiration) under conditions of good water availability. These differences could not be explained by differences in  $g_s$ , but it is possible that small differences in growth could have contributed, at least in part, to the lower transpiration of the Embrapa 48 plants. In addition, in more advanced stages of water deficit, mechanisms related to drought tolerance (i.e., a reduction of osmotic potential) were observed for the Embrapa 48 plants, which are likely related to the emergence of stress symptoms and co-occurred with leaf water potentials of -4.21 MPa.

Differences between the D2A plants and their isoline, the drought-sensitive BR 16 cultivar, were more variable. Although reduced transpiration occurred under conditions of good water availability in the control situation and there was improvement of the water status under water deficit relative to the BR 16 cultivar, the D2A leaf wilting was similar to the BR 16 cultivar. However, it is worth noting that, under drought stressed, the D2A line exhibited less electrolyte leakage and smaller reductions in growth than the BR 16 cultivar.

In field conditions, the Embrapa 48 cultivar had greater productivity than the

other materials tested. The greatest differences between the BR 16 cultivar and the D2A line were in the total number of pods and the number of seeds, which were greater for the D2A line when stress was applied in the vegetative stage. Although not statistically significant, the productivity of the D2A line was 25.17% greater than that of the BR 16 cultivar. Further studies are necessary to determine the climatic and soil conditions in which the D2A line could surpass the drought-sensitive cultivar BR 16. The next step could possibly be to expand the field tests to locations with different drought patterns (as Paraná and Rio Grande do Sul).

### **5.7 CONCLUSION**

In conclusion, the Embrapa 48 cultivar and the D2A line showed characteristics related to drought avoidance (as the conservative use of water under conditions of adequate water supply) and BR16 early vigor as drought avoidance too. The Embrapa 48 cultivar also showed characteristics related to drought tolerance (lowering of osmotic potential) and showed had greater productivity than the other cultivars studied.

### **5.8 ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank the members of laboratories of Plant Biotechnology and Ecophysiology at EMBRAPA Soybean, Brazil.

## 5.9 LITERATURE CITED

- Asghar R, Fenton RD, Demason DA, Close TJ** (1994) Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. *Protoplasma* **177**: 87-94.
- Barrs, HD** (1968) Effect of cycle variations in gas exchange under constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. *Physiol Plant* **21**: 918-929.
- Belin C, Thomine S & Schroeder JI** (2010) Water balance and the regulation of stomatal movements. In A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert, eds, *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer, Netherlands, pp 283–305.
- Bhatnagar-Mathur P, Devi MJ, Reddy DS, Lavanya M, Vadez V, Serraj R, Yamaguchi-Shinozaki K, Sharma KK** (2007) Stress inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water limiting conditions. *Plant Cell Rep* **26**: 2071–2082.
- Blum A** (1988) *Breeding for Stress Environments*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 245.
- Blum A & Ebercon A** (1981) Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci* **21**: 3-47.
- Canteri MG, Althaus RA, Filho JSV, Giglioti EA, Godoy CV** (2001) SASM-Agri – Sistema para análise de separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Rev Bras de Agrocomp* **1**: 18-24.
- Chen M, Wang QY, Cheng XG, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Xia LQ, Ma YZ** (2007) *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun* **353**: 299-305.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012**. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2012. 30 p.
- Cong L, Zheng HC, Zhang YX, Chai TY** (2008) *Arabidopsis* DREB1A confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in Tobacco. *Plant Sci* **174**: 156-164.
- Crusiol LGT, Carvalho JFC & Farias JRB** (2012) Análise da disponibilidade hídrica na fazenda da Embrapa Soja (Londrina, PR) nas safras de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012, 99–107.
- Cui XH, Hao FS, Chen H, Chen J, Wang XC** (2008) Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *J Plant Res* **121**: 207–214.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Cultivares de Soja: Regiões Sul e Central do Brasil (2010), Londrina.
- Engels C, Fuganti-Pagliarini R, Marin SRR, Marcelino-Guimarães FC, Oliveira MCN, Kanamori N, Mizoi J, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nepomuceno AL** (2013) Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in the leaves and roots during dehydration. *Gen Mol Biol* (in press).
- Farias JRB, Neumaier N, Nepomuceno AL, Delatre N, Bordignon JR, Oya T, Zapparoli MLM, Casagrande EC** (1999). Respostas da Cultura da Soja à Disponibilidade Hídrica. *Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja*. **142**:73-76.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pernigton JS** (1971) Stage of development description for soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Crop Sci* **11**:929-

931.

**Fisher DB** (1967) An unusual layer of cells in the mesophyll of soybean leaf. *Bot Gaz* **128**: 215-218.

**Fuganti-Pagliarini R, Carvalho JFC, Rolla-Santos AAP, Engels C, Molinari MDC, Vasquez G, Marin SRR, Kanamori N, Farias JRB, Neumaier N, Oliveira MCN, Yamaguchi-Shinozaki K, Nepomuceno AL** (2011) Análise fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os genes *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob déficit hídrico em condições experimentais de campo. In: Mercosoja, 2011, Rosário, Argentina.

**Galmés J, Medrano H & Flexas J** (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol* **175**: 81-93.

**Gao T, Wu Y, Zhang Y, Liu L, Ning Y, Wang D, Tong H, Chen S, Chu C, Xie Q** (2011) *OsSSIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Mol Biol* **76**:145–156.

**Gilbert MA, Zwieniecki MA & Holbrook, MN** (2011) Independent variation in photosynthesis capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. *J Exp Bot* **62**: 2875-2887.

**Guan YS, Serraj R, Liu SH, Xu JL, Ali J, Wang WS, Venus E, Zhu LH, Li ZK** (2010) Simultaneously improving yield under drought stress and non-stress conditions: a case study of rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* **61**: 4145–4156.

**Hou X, Xie KB, Yao JL, Qi ZY, Xiong LZ** (2009) A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6410–6415.

**Hufstetler EV, Boerma HR, Jr Carter TE, Earl HJ** (2007) Genotypic Variation for Three Physiological Traits Affecting Drought Tolerance in Soybean. *Crop Sci* **47**: 27-35.

**Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* **47**: 141-153.

**James RA, Davenport RJ & Munns R** (2006) Physiological characterization of two genes for Na<sup>+</sup> exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol* **142**:1537-1547.

**James AT, Lawn RJ & Cooper M** (2008) Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. II. Inter-relations between epidermal conductance, osmotic potential, relative water content, and plant survival. *Aust J Agric Res* **59**: 670 - 678.

**Jennings DH** (1976) The effects of sodium chloride on higher plants. *Biol Rev Camb Philos Soc* **51**: 453–486.

**Jiang Q, Zhang J-Y, Guo X, Bedair M, Sumner L, Bouton J, Wang Z-Y** (2010) Improvement of drought tolerance in white clover (*Trifolium repens*) by transgenic expression of a transcription factor gene *WXP1*. *Funct Plant Biol* **37**: 157–165.

**Katul G, Manzoni S, Palmroth S, Oren R** (2010) A stomatal optimization theory to describe the effects of atmospheric CO<sub>2</sub> on leaf photosynthesis and transpiration. *Ann Bot* **105**: 431–442.

**Kholová J, Hash CT, Kumar PL, Yadav RS, Kocová M, Vadez V** (2010) Terminal drought-tolerant pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] have high leaf ABA and

- limit transpiration at high vapour pressure deficit. *J Exp Bot* **61**: 1431-1440.
- Kulcheski FR, Oliveira LFV, Molina LG, Almerao MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimaraes FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GAG, Margis R** (2011) Identification of novel soybean *microRNAs* involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* **12**: 1-17.
- Lawlor DW** (2013) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *J Exp Bot* **63**: 695 – 709.
- Lemos LB, Farinelli R, Cavariani C, Zapparoli RA** (2011) Desempenho agrônômico e produtivo de cultivares de soja em diferentes safras. *Científica* **39**: 44 – 51.
- Li Z, Baldwin CM, Hu Q, Liu H, Luo H** (2010) Heterologous expression of Arabidopsis H<sup>+</sup>-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Plant Cell Environ* **33**: 272–289.
- Lopato S & Langridge P** (2011) Engineering Stress Tolerance in Cereals Using DREB/CBF Genes: Outcomes, Problems and Perspectives. *ISB News Rep*: 7-9.
- Ludlow MM & Muchow RC** (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water- limited environments. *Adv Agron* **43**: 107–153.
- Melchiorre M, Robert G, Trippi V, Racca R, Lascano HR** (2009) Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. *Plant Growth Regul* **57**: 57–68.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. *Plant Physiol* **149**: 88-95.
- Nepomuceno AL, Oosterhuis DM & Stewart JM** (1998) Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environ Exp Bot* **40**: 29-41.
- Nguyen B, Brar D, Bui B, Nguyen T, Pham L, Nguyen H** (2003) Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa*; L.). *Theor Appl Genet* **106**:583-593.
- Oya T, Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Tobita S, Ito O** (2004) Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars. *Plant Prod Sci* **7**: 129-137.
- Passioura JB** (2006) The perils of pot experiments. *Funct Plant Biol* **33**: 1075–1079.
- Polizel AM, Medri ME, Nakashima K, Yamanaka N, Farias JRB, Oliveira MCN, Marin SRR, Abdelnoor RV, Marcelino-Guimarães FC, Fuganti R, Rodrigues FA, Stolf-Moreira R, Beneventi MA, Rolla AAP, Neumaier N, Yamaguchi-Shinozaki K, Carvalho JFC, Nepomuceno AL** (2011) Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genet Mol Res* **10**: 3641-3656.
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran L-S P, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki, K** (2007) Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stress in *Zea mays* L. *Plant J* **50**: 54–59.
- Ray JD & Sinclair TR** (1997) Stomatal closure of maize hybrids in response to soil drying. *Crop Sci* **37**, 803–807.
- Rodrigues FA, Marcolino-Gomes J, Carvalho JFC, Nascimento LC, Neumaier N, Farias JRB, Carazzolle MF, Marcelino FC, Nepomuceno AL** (2012) Subtractive

libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet Mol Biol* **35**: 304-314.

**Rorat T** (2006) Plant dehydrins-tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett* **11**: 536-556.

**Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* **18**: 1292–1309.

**Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18822–18827.

**Saravitz DM, Pharr DM & Carter TE** (1987) Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol* **83**: 185-189.

**Schmidt JJ, Blankenship EE & Lindquis JL** (2011) Corn and Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Transpiration in Response to Drying Soil. *Weed Sci* **59**:50–54.

**Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, Ganguli A, English G, Vierling E, von Koskull-Döring P** (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J* **53**:264–274.

**Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K** (1999) Molecular responses to drought stress. In K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki, eds, *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, R.G. Landes Company, Austin, pp 11-28.

**Thorntwaite CW & JR Mather** (1955) *The Water Balance*. Climatology, Ed 1 Vol 8. Drexel Institute of Technology Laboratory of Climatology, Centerton, pp 1-104.

**Tuberosa R** (2012). Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol* **3**: 1-26.

**Tyerman SD, Niemietz CM & Bramley H** (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* **25**: 173–194.

**Vadez V & Sinclair TR** (2001) Leaf ureide degradation and N<sub>2</sub> fixation tolerance to water deficit in soybean. *J Exp Bot* **52**:153–159.

**Wang Q, Guan Y, Wu Y, Chen H, Chen F, Chu C** (2008) Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice. *Plant Mol Biol* **67**:589–602.

**Woo NS, Badger MR & Pogson BJ** (2008) A rapid non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* **4**: 27.

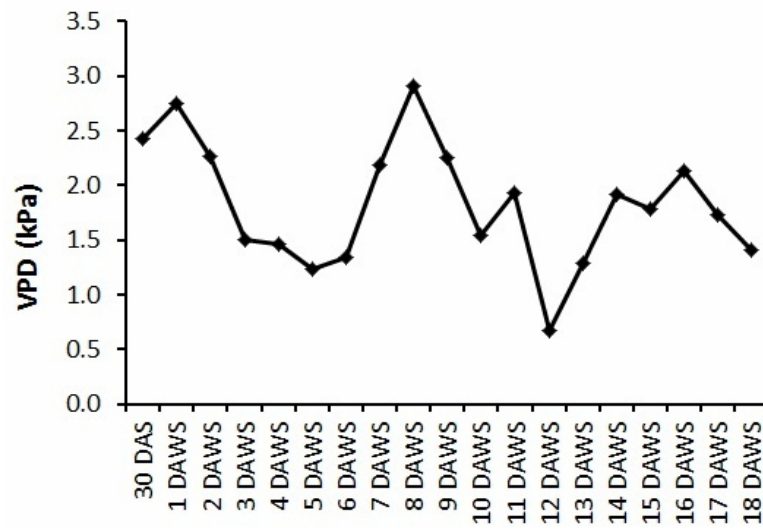
**Xiong X, James VA, Zhang H, Altpeter F** (2010) Constitutive expression of the barley *HvWRKY38* transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). *Mol Breed* **25**:419–432.

**Yue B, Xue WY, Xiong LZ, Yu XQ, Luo LJ, Cui KH, Jin DM, Xing YZ, Zhang QF** (2006) Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics* **172**: 1213–1228.

**Zaman-Allah M, Jenkinson DM & Vadez V** (2011) A conservative pattern of water use, rather than deep or profuse rooting, is critical for the terminal drought tolerance of chickpea. *J Exp Bot* **62**: 4239–4252.

**Zhou ML, Zhang Q, Zhou M, Sun ZM, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM** (2012) Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize.

Glycobiology **22**: 1775-1785.



**Supplementary Figure S1.** The mean daily vapor pressure (kPa) deficit (VPD) recorded over the experimental period in the greenhouse. DAS means days after sowing and DAWS means days after water stress.

## CAPÍTULO II

### 6 Análise *in silico* e *in vitro* de promotores induzidos em cultivar de soja tolerante à seca

#### 6.1 RESUMO

O déficit hídrico, juntamente com a alta salinidade, compreendem os fatores ambientais que mais afetam o crescimento e a produtividade das plantas. Para o desenvolvimento de plantas de soja mais tolerantes à seca é essencial que pesquisas de regulação da expressão gênica sejam realizadas. Assim, o perfil de expressão gênica de cultivares de soja contrastantes para a tolerância ao déficit hídrico foi analisado através de microarranjos de cDNA. A partir desse perfil foram escolhidos transcritos que apresentaram FC>20 e cujos promotores continham *cis* elementos de resposta à seca, da cascata dependente de ABA como o ABRE, MYCR, MYBR e NACR para estudar os seus promotores, que foram dos genes *LTI* (*Low Temperature Induced*), *Mat1*, *Mat9* (*Maturation-associated protein 1 e 9*), *HSP26/42* (*Heat shock protein 26/42*) e o Glyma11g16120. Na ferramenta do Plant Pan o promotor *LTI* apresentou a ativação dos seguintes *cis*-elementos: ABRE (3x), ABF (1x), MYC (10x) e MYB (11x) e ainda uma maior ativação do gene GUS no ensaio de expressão transiente, realizado para quantificar a ativação dos promotores em relação ao promotor do gene *RD29B*. Os outros dois promotores que apresentaram alta ativação do gene GUS foram o *Mat1* e *Mat9*. Estes transcritos também apresentaram os *cis*-elementos ABRE (5x), MYCR (5x) e sete MYB (7x) para *Mat1* e ABREs (6), sete MYCR (7) e MYBR (8) para *Mat 9*. Os promotores do Glyma11g16120 e do gene *HSP26/42* apresentaram baixa ativação do GUS no ensaio de expressão transiente sob condições de ABA e poucos *cis*-elementos ABRE (2x), MYCR (7) e MYBR (5) presentes em sua região promotora. Os resultados obtidos no Genevestigator, mostraram ainda expressão diferencial dos genes e Glyma estudados em condições de estresses abióticos e bióticos, estágio de desenvolvimento e partes anatômicas. Os promotores *LTI*, *Mat1* e *Mat9* foram considerados fortes candidatos para o uso em estratégias de engenharia genética para pesquisa básica e aplicada que visem a obtenção de plantas geneticamente modificadas mais tolerantes a estresses abióticos como o déficit hídrico.

**Palavras-chaves:** *cis*-elemento, ABA, transiente assay, expressão gênica

## 6.2 INTRODUÇÃO

As plantas, em seu ambiente natural, estão expostas a diversas condições adversas. O déficit hídrico é um dos fatores ambientais que mais afetam o crescimento e a produtividade das plantas (Yoshida et al., 2010). A ocorrência de períodos prolongados de estiagem, principalmente durante o verão, tem se tornado cada vez mais frequente. Logo, prejuízos financeiros são significativos em diversas regiões produtoras (Manavalan et al., 2009). Este evento desencadeia a necessidade do desenvolvimento de cultivares cada vez mais aclimatadas aos estresses abióticos.

Estudos de transcriptoma sob diferentes condições de estresse abiótico já foram realizados em diversas espécies incluindo a soja sob desidratação e déficit hídrico (Le et al., 2012; Maruyama et al., 2012). A partir das pesquisas sobre a resposta das plantas ao déficit hídrico, o conhecimento obtido sobre como a maquinaria celular e molecular ativa e regula a expressão de genes (transcriptoma) responsivos é essencial para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes a falta de água.

Além da importância de prospectar genes envolvidos na resposta da planta ao estresse, a busca por promotores induzidos nestas condições adversas tem se tornado cada vez mais importante, como observado no estudo de caracterização realizado por Maruyama et al., (2012) em plantas de soja. Como um dos componentes principais da célula, os promotores são um dos responsáveis pela ativação e regulação da expressão gênica através da ligação de fatores de transcrição nos *cis*-elementos presentes nestas sequências, que sinalizam para diversos estresses.

Dentre as cascatas de transdução de sinais envolvidos na resposta ao déficit hídrico, encontram-se genes induzidos e não induzidos por ABA (ácido abscísico) (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Foram encontrados na região promotora dos genes responsivos ao ABA principalmente os *cis*-elementos ABRE (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000), sítios de reconhecimento MYC (Abe et al., 1997), MYB (Urao et al., 1993) e NAC (Tran et al., 2004) e na região promotora dos genes da rota independente de ABA encontra-se DRE (Liu et al., 1998).

Alguns dos genes da cascata de resposta ao déficit hídrico têm sido estudados por meio da sua inserção, via transformação genética, em plantas modelo e também plantas de interesse econômico. Nestes estudos têm se utilizado promotores constitutivos como o 35S (Sakuma et al., 2006; Ito et al., 2006; Valente et al., 2009) e estresse induzidos (Engels et al., 2013; Polizel et al., 2011; Sakuma et al., 2006). No entanto, a utilização de promotores constitutivos pode em alguns casos resultar em efeitos indesejáveis como a redução na produção de sementes, retardo de crescimento e desenvolvimento anormal em decorrência da constante síntese do transcrito e do gasto energético (Yi et al., 2010). Esses problemas podem ser minimizados com promotores estresses induzidos, ativados apenas no momento em que a planta está sob estresse, produzindo e acumulando o produto ou subproduto transgênico apenas em condições de estresse.

O fator de transcrição *AtDREB1A*, presente na cascata ABA dependente de resposta à seca, foi introduzido sob o controle do promotor estresse induzido *rd29A*, e aumentou com sucesso a tolerância à seca em tabaco (Kasuga et al., 2004), trigo (Gao et al., 2009) e soja (Polizel et al., 2011). O promotor estresse induzido *rd29A* também foi utilizado por Engels et al., (2013) em uma construção gênica com *AtDREB2A* CA em soja e observaram a maior expressão do transgene em condições de déficit hídrico quando comparada às condições controle.

Outros promotores estresse induzidos têm sido isolados e utilizados na obtenção de PGMs (Plantas Geneticamente Modificadas), como o caso do promotor contendo os *cis*-elementos ABRE, CAM box, e CRT isolado de *Arabidopsis* e regulado por cálcio (Whalley et al., 2011). Os promotores dos genes *Rab21*, *Wsi18*, *LEA3*, *Uge1*, *Dip1* e *R1G1B* de arroz, escolhidos por serem induzidos sob seca, foram analisados por Yi et al. (2010) em todos os estádios de crescimento do arroz, antes e depois de serem expostos ao déficit hídrico, e todos apresentaram indução de diferentes genes nos diferentes tecidos. Saad et al. (2011) inseriram o promotor do gene *AISAP* que codifica a proteína A20/AN1, zinc-finger associada ao estresse e induzida por estímulos hormonais e salinidade, frio, seca, calor, ABA e ácido salicílico, na gramínea *Aeluropus littoralis*. Os resultados indicaram que esse promotor, induzido por tratamentos de estresse osmótico, seca, salinidade, ABA e ácido salicílico, é específico para órgão e tecido e sua ação dependente da idade.

Esse e outros estudos têm indicado a importância da utilização de promotores estresse induzidos na agricultura (Lim et al., 2012).

Assim, a biotecnologia vem utilizando construções gênicas com promotores estresses induzidos e com genes de interesse que respondam e aumentem a tolerância a estresses abióticos, o que demonstra a importância de estudos com promotores e o posterior isolamento para a obtenção de PGMs. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo selecionar promotores responsivos ao déficit hídrico através da análise dos promotores induzidos sob déficit hídrico na cultivar de soja Embrapa 48 e pela análise *in vitro* da ativação do gene repórter GUS na presença de ABA.

### 6.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 6.3.1. Cultivo do material vegetal e aplicação do tratamento experimental

Plantas da cultivar de soja considerada tolerante à seca, Embrapa 48 (Capítulo 1), foram cultivadas em casa-de-vegetação sob condições de 12h de luz (28°C) sob  $50 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2/\text{s}$  e 12h de escuro (25°C) por aproximadamente quatro semanas (est\u00e1dio V<sub>4</sub>, Fehr et al., 1971). Essas plantas foram submetidas ao d\u00e9ficit h\u00eddrico por suspens\u00e3o da irriga\u00e7\u00e3o por dois e seis dias. Foram escolhidos dois tratamentos para realiza\u00e7\u00e3o do experimento: a) d\u00e9ficit h\u00eddrico moderado (dois dias) e b) severo (seis dias) segundo o estudo de Engels et al. (2014b), no qual foram considerados os valores de condut\u00e2ncia estom\u00e1tica de  $g_s = 0,1$  a  $0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  como d\u00e9ficit h\u00eddrico moderado e  $g_s < 0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  como d\u00e9ficit h\u00eddrico severo. Em ambos os tratamentos o tecido foliar de plantas sob d\u00e9ficit h\u00eddrico e de plantas em condi\u00e7\u00f5es normais de crescimento (controle) foram coletadas e armazenadas a -80°C para posteriores an\u00e1lises de express\u00e3o g\u00eanica. O delineamento experimental desse experimento foi inteiramente casualizado com 3 repeti\u00e7\u00f5es.

Um segundo experimento foi desenvolvido com plantas da cultivar Embrapa 48 (do Brasil), da Williams 82 (dos Estados Unidos da Am\u00e9rica) e da Nourin2 (do Jap\u00e3o). Estas plantas foram cultivadas em casa-de-vegeta\u00e7\u00e3o, nas mesmas condi\u00e7\u00f5es descritas acima, e submetidas \u00e0 supress\u00e3o da irriga\u00e7\u00e3o por dois, quatro e seis dias consecutivos. O RNA total extra\u00eddo das folhas foi utilizado em an\u00e1lise de

RT-qPCR para avaliar a expressão relativa de determinados genes selecionados a partir dos resultados obtidos no Microarranjos de DNA.

### **6.3.2. Extração de RNA total e microarranjos de DNA**

O RNA total das amostras foi extraído com reagente RNAiso (TakaRa Bio Inc) segundo as recomendações do fabricante (<http://www.takara-bio.com/>). Após as análises de qualidade e reações de purificação com DNase I (Invitrogen), a síntese de cDNA foi realizada segundo Qin et al. (2008).

Amostras de RNA total isoladas de folhas da cultivar Embrapa 48 submetidas ao déficit hídrico moderado e severo (dois e seis dias sem irrigação, respectivamente) foram utilizadas para o estudo de transcriptoma através da técnica de Microarranjo de cDNA. Nesta análise foi utilizada uma lâmina Oligo Microarranjo previamente desenhada por Maruyama et al. (2012) contendo 43.640 genes de soja codificadores de proteínas. A construção do Oligo Microarranjo foi realizada pela Agilent Technologies Inc. O RNA total foi usado como molde para a síntese da sonda utilizando o Low RNA Input Linear Amplification/Labeling Kit (Agilent Technologies Inc) e, após a hibridização das lâminas, a imagem foi capturada pelo Scanner G2505C (Programa de controle de scan, Versão A.8.5.1; Agilent Technologies Inc) e transformada em valores numéricos com o programa Feature Extractions (Versão 10.10.1.1; Agilent Technologies Inc). Os dados foram analisados pelo programa GeneSpring GX (versão 11.5.1; Tecnologia Agilent), considerando as replicatas técnicas e biológicas, o qual realiza a normalização usando o método Lowess (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*) (Quackenbush, 2002) e calcula as razões de expressão gênica corrigidas pelo método de Benjamini e Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) (taxa de falsa descoberta, do inglês False Discovery Rate) a 1% de significância.

### **6.3.3 Análise da expressão gênica**

O conjunto de genes diferencialmente expressos, detectados respectivamente no déficit hídrico moderado e severo, foi comparado utilizando-se diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para se verificar os grupos

de genes que apresentaram o mesmo padrão de expressão em ambos os tratamentos.

As sequências de aminoácidos dos respectivos transcritos foram obtidas do banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) e submetidas ao programa HMMER (Eddy, 1998) para comparar as sequências aos bancos de dados Pfam (Hunter et al., 2009) e InterPro (Quevillon et al., 2005). As funções moleculares foram identificadas a partir da anotação dos termos GO e organizadas em um *heat map*. A anotação funcional foi ainda complementada utilizando os bancos de dados KEGG (Ogata et al., 1999), PlantCyc (Zhang et al., 2010), Kappa-view (Sakurai et al. 2011) e GRAMENE (Ware et al., 2002).

#### **6.3.4 Análise de RT-qPCR para validação da expressão gênica**

A análise de expressão gênica foi realizada utilizando transcritos que apresentaram expressão (Fold-Change\_FC) maior que 4 vezes (em relação à planta controle) na planta submetida a ambos os tratamentos ou em apenas um deles. As análises foram realizadas utilizando o gene *GmrRNA18S* (Acesso No.: X02623.1) como gene referência (Stolf-Moreira et al., 2011). Os iniciadores dos genes-alvo utilizados nas reações estão descritos na Tabela Suplementar 1.

As reações de amplificação foram conduzidas em triplicata técnica no termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem) e foram compostas por 2x mix Syber Takara®, 50x Rox Dye (Takara®), aproximadamente 100ng de DNA, 2 µM de cada iniciador F (Forward) e R (Reverse) e para completar o volume final de 10 µL da reação 3,4 µL de água ultrapura. As reações foram amplificadas nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação de 95°C por 10 s, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 5 s e 60°C por 35 s e um estágio de dissociação de 95°C por 15 s, seguidos de 60° por 1 min, 95°C por 15 s e 60°C por 15 s. A análise dos dados foi realizada segundo Livak & Schmittgen (2001) utilizando como referência endógena os valores de Ct do gene *GmrRNA18S* e como calibrador (controle) os valores de  $\Delta$ Ct do controle de cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Tukey a 5% de significância (SasmAgri).

### 6.3.5 Seleção e análise de promotores induzidos

Os transcritos que apresentaram a expressão altamente induzida (FC >20) em ambas as condições experimentais e que apresentaram em suas sequências *cis*-elementos identificados como envolvidos na resposta à seca foram selecionados para as análises *in vitro*. A partir dos dados de expressão e anotação foram escolhidos genes com funções de chaperona molecular (HSP26/42, Glyma14g11420), desidrinas Mat1 e Ma9 (Glyma07g10030, Glyma09g31740, respectivamente), LTI (*Low Temperature Induced*) (Glyma20g29770) e Glyma11g16120 (cuja função é desconhecida no presente momento). Os transcritos selecionados foram ainda caracterizados quanto às perturbações (diferentes estresses abióticos e bióticos), regiões anatômicas e estágio de desenvolvimento utilizando o Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/>), e os *cis*-elementos presentes na sequência dos promotores foram analisados pelo programa PlantPAN (Chang et al., 2008).

### 6.3.6 Clonagem gênica e construção dos plasmídeos

Para a construção dos plasmídeos *promotor:gene repórter GUS*, DNA genômico foi extraído de plantas de soja Embrapa 48 pelo método CTAB (Rogers & Bendich, 1988) com algumas modificações. O DNA foi utilizado em uma reação de amplificação com os iniciadores que amplificaram apenas as regiões promotoras dos genes e inseriram a esses produtos amplificados sítios específicos de enzimas de restrição no início e fim de cada região promotora. As sequências geradas nessa reação de amplificação, juntamente com o plasmídeo PBI221, foram digeridas com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamH1* para promover a síntese de extremidades coesivas nas sequências dos promotores dos genes de interesse e a retirada do promotor GUS no plasmídeo PBI221. Após a digestão, os fragmentos dos promotores de interesse gerados foram clonados (ligados) ao fragmento do plasmídeo pBI221 em reações individuais. Para se verificar as sequências dos plasmídeos gerados, a região promotora dos genes juntamente com a região codante do gene GUS e o terminador Nos foram sequenciadas. Após a verificação das sequências, os plasmídeos foram utilizados em um ensaio de expressão transiente.

### **6.3.7 Ensaio de expressão transiente em protoplastos de mesofilo de *Arabidopsis thaliana***

O ensaio de expressão transiente em protoplastos de *A. thaliana* foi realizado segundo Yoo et al. (2007) com pequenas modificações. Foi utilizado o plasmídeo pBI221\_35S:Ω\_Emerald LUC como controle interno de cada reação, normalizador da eficiência da transfecção, o plasmídeo pBI221\_RD29Bpro:GUS como controle do experimento e o ácido abscísico (ABA) como agente estressor do déficit hídrico. Os ensaios de expressão transiente foram realizados em triplicatas e o resultado final gerado a partir da média dessas triplicatas.

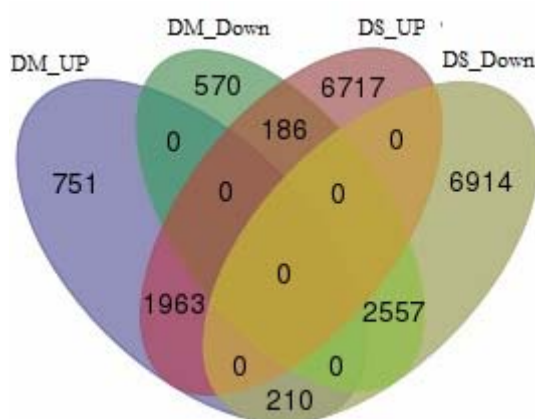
As etapas para a realização de expressão transiente em protoplastos de *A. thaliana* foram as seguintes a) Isolamento de protoplastos de folhas expandidas de 5 a 6 semanas de idade de *A. thaliana* (Yoo et al., 2007). Neste procedimento, 30 folhas expandidas e novas foram adicionadas em 25 mL de solução de enzimas contendo 1,5 % de celulase R10 e 0,4% de macerozime R10 e digeridas a 22 °C por três horas e meia. Após esse tempo a digestão foi interrompida e o tecido foliar não digerido removido; b) Co-transfecção de DNA mediada por PEG (polietilenoglicol) e cálcio. Nessa etapa, 5µg de plasmídeo contendo o plasmídeo efetor (com o promotor selecionado) e 1 µg do plasmídeo Emerald LUC, controle interno, foram transfectados para o interior dos protoplastos (100 µL de protoplastos a  $2 \times 10^4$ ) com a solução de 110 µL de solução de 40% PEG (40% de PEG 4000, 0,2 M de manitol e 100mM de  $\text{CaCl}_2$ ). Após incubação por 15 min em temperatura ambiente a mistura da transfecção foi diluída e ressuspensa com solução WI (4 mM MES; 0,5M de manitol e 20mM de KCl) contendo ABA (100mM) para a condições estressada e etanol para controle da reação; c) Cultura do Protoplasto. Nesta etapa, os protoplastos permaneceram incubados no escuro por 16h a 22°C e, após a remoção do supernadante, os protoplastos foram mantidos no gelo; d) Experimento repórter, onde os protoplastos foram lisados com tampão de lise (2,5 mM de Tris, 1 mM de DDT, 2mM de DACTAA, 10% de Glycerol e 1% de TritonX100), e adicionados ao mix LUC (Promega) para medição da atividade do LUC ou adicionados no mix com substrato para GUS (1 mg de 4-MUG, tampão para substrato do GUS, 10mM de Tris-HCl, 2mM  $\text{MgCl}_2$ ) para medição da atividade do GUS.

## 6.4. RESULTADOS

### 6.4.1. Identificação de genes responsivos à seca

Foram identificados 6.237 e 18.547 transcritos diferencialmente expressos (para up regulados  $FC >2$  e down regulados  $FC <-2$ ) em resposta ao déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. No déficit hídrico moderado (dois dias) foram identificados 2.924 transcritos up regulados ( $FC >2$ ) e 3.313 down regulados ( $FC <-2$ ). Já as plantas submetidas ao déficit hídrico severo (seis dias de déficit) apresentaram 8.866 transcritos up regulados ( $FC >2$ ) e 9.681 down regulados ( $FC <-2$ ). Todos os genes identificados no déficit hídrico moderado e severo, assim como a respectiva anotação funcional.

Após comparar os conjuntos de transcritos diferencialmente expressos (Figura 1), pode ser observado que, comparado ao estresse moderado (6.237), um maior número de transcritos diferencialmente expressos foi identificado na condição de déficit hídrico severo (18.547). O mesmo perfil de expressão foi observado tanto para os transcritos up regulados (2.924 e 8.866), quanto para os down regulados (3.313 e 9.681), sob condições de déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. Entre os transcritos up regulados, 1.963 foram identificados como diferencialmente expressos em ambas as condições de déficit hídrico, 751 apenas no déficit moderado e 6.717 no severo (Figura 1). Quanto aos transcritos down regulados, 2.557 foram reprimidos em ambos os períodos, 570 identificados unicamente no déficit hídrico moderado e 6.914 no severo (Figura 1). Duzentos e dez transcritos foram superexpressos no déficit moderado e reprimidos no severo e o oposto foi observado com outros 186 transcritos identificados como superexpressos no déficit hídrico severo e reprimidos no moderado (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama de Venn mostrando os conjuntos de genes diferencialmente expressos em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico moderado (DM – 2 dias de desidratação) e déficit hídrico severo (DS – 6 dias de desidratação). Déficit Hídrico Moderado (total de transcritos diferencialmente expressos = 5.924) e Déficit Hídrico Severo (total de transcritos diferencialmente expressos = 18.149).

Dentre os genes identificados nos tratamento de déficit hídrico, 3.717 foram classificados de acordo com as funções moleculares do Gene Ontology. Os transcritos que apresentaram maior expressão no déficit hídrico severo foram classificados na classe das desidrinas e proteínas LEA, seguidos da classe de ubiquitinação e metabolismo de outros aminoácidos (Figura 2). Dados semelhantes foram obtidos para os transcritos diferencialmente expressos no déficit hídrico moderado, com exceção da classe de ubiquitinação, uma vez que neste tratamento a maior expressão ocorreu para a classe de metabolismo de lipídios (Figura 2). O perfil de expressão para os transcritos identificados como reprimidos (down regulados) foi semelhante no déficit hídrico moderado e severo. Dentre esses transcritos estão os da classe da fotossíntese, biossíntese de outros metabólitos secundários e metabolismo e biodegradação de xenobióticos (Figura 2).

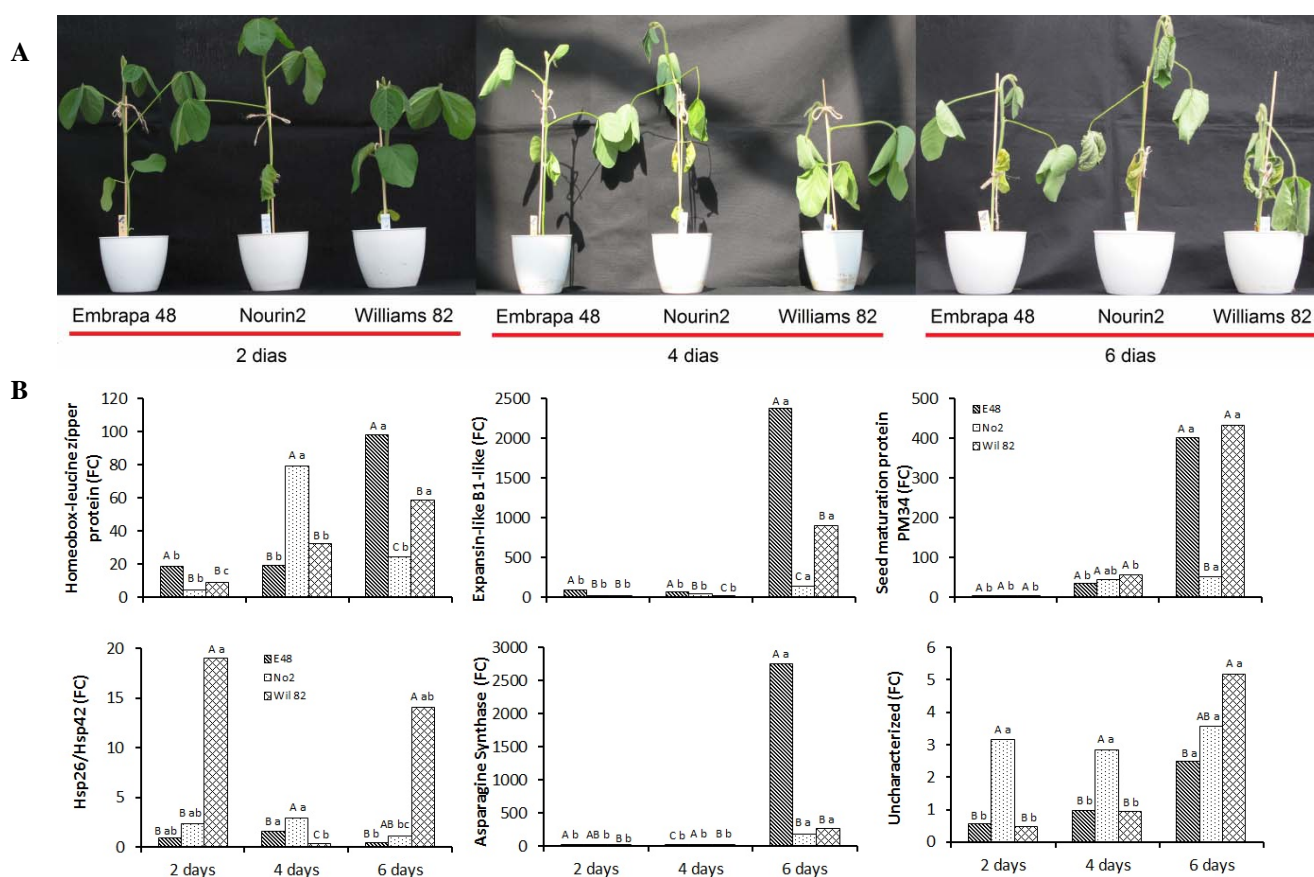
class	array	up		down		up		down	
		W2	W6	W2	W6	W2	W6	W2	W6
Carbohydrate Metabolism	2225	156	399	253	661	7.0	17.9	11.4	29.7
Energy Metabolism	1070	49	190	98	267	4.6	17.8	9.2	25.0
Lipid Metabolism	897	88	199	92	265	9.8	22.2	10.3	29.5
Nucleotide Metabolism	676	42	119	38	118	6.2	17.6	5.6	17.5
Amino Acid Metabolism	1395	112	305	96	350	8.0	21.9	6.9	25.1
Metabolism Of Other Amino Acids	570	61	161	51	127	10.7	28.2	8.9	22.3
Glycan Biosynthesis And Metabolism	256	14	47	30	65	5.5	18.4	11.7	25.4
Metabolism Of Cofactors And Vitamins	753	48	123	76	225	6.4	16.3	10.1	29.9
Metabolism Of Terpenoids And Polyketides	340	28	52	25	104	8.2	15.3	7.4	30.6
Biosynthesis Of Other Secondary Metabolites	1184	84	205	152	382	7.1	17.3	12.8	32.3
Xenobiotics Biodegradation And Metabolism	851	67	181	125	253	7.9	21.3	14.7	29.7
Biosynthesis Of Plant Hormones	822	62	131	57	252	7.5	15.9	6.9	30.7
Photosynthesis	184	7	11	41	137	3.8	6.0	22.3	74.5
Signal Transduction	3966	241	830	244	810	6.1	20.9	6.2	20.4
Transcription	4920	306	889	257	806	6.2	18.1	5.2	16.4
Translation	1527	27	152	38	305	1.8	10.0	2.5	20.0
Epigenetics	170	3	38	4	11	1.8	22.4	2.4	6.5
Molecular Chaperone	972	73	206	47	190	7.5	21.2	4.8	19.5
DNA Replication Repair	671	23	111	47	85	3.4	16.5	7.0	12.7
Helicase	305	3	47	12	30	1.0	15.4	3.9	9.8
Ribonuclease	216	17	39	3	32	7.9	18.1	1.4	14.8
Ubiquitination	1000	67	285	20	76	6.7	28.5	2.0	7.6
Protease&Peptidase	1387	93	293	68	215	6.7	21.1	4.9	15.5
Transport	2684	156	513	223	568	5.8	19.1	8.3	21.2
Detoxification Enzyme	401	29	92	34	83	7.2	22.9	8.5	20.7
Dehydrin&Lea	77	16	32	3	16	20.8	41.6	3.9	20.8
other	24816	1525	4860	1710	5077	6.1	19.6	6.9	20.5

**Figura 2.** Heat Map apresenta as funções moleculares de 27 transcritos up regulados (vermelho) e down regulados (azul). Parte colorida apresenta a frequência (%) de genes responsivos à desidratação nas plantas avaliadas após dois (W2) e seis dias (W6) sob déficit hídrico.

#### 6.4.2 Análise de transcritos diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico moderado e severo via RT-qPCR.

Para validar os resultados obtidos com os microarranjos de cDNA, o perfil de expressão de alguns transcritos diferencialmente expressos, que apresentaram  $FC > 4$  nas plantas submetidas a um ou ambos os tratamentos de déficit hídrico, foi analisado em amostras das cultivares Embrapa 48, Nourin2 e Williams 82 sob condições de déficit hídrico. O déficit hídrico imposto às plantas mostrou que todas as cultivares apresentaram murcha progressiva no decorrer dos dias sem irrigação, sendo este efeito mais pronunciado no sexto dia do tratamento experimental (Figura 3A).

A análise da expressão gênica indicou que na cultivar Embrapa 48 os valores de expressão gênica foram maiores no déficit hídrico severo (seis dias de desidratação) para os genes que codificam as proteínas homeobox zíper de leucina, expansina-like B1-like e asparagina sintase quando comparado às cultivares Williams 82 e Nourin2 (Figura 3B). Para o gene codificador da proteína de maturação de semente PM34, a Embrapa 48 apresentou resultado superior ao da cultivar Nourin2. Para o gene da expansina-like B1-like, os maiores valores de expressão foram identificados no déficit hídrico moderado nas cultivares Embrapa 48 e Nourin2. Contudo, para o gene Hsp26/Hsp42 a maior expressão (quatro dias de déficit hídrico) foi detectada na cultivar Williams 82 (Figura 3B).



**Figura 3.** (A) Cultivares Embrapa 48, Nourin2 e Williams 82 submetidas ao déficit hídrico moderado (dois e quatro dias sem irrigação) e severo (seis dias sem irrigação). (B) Análise de expressão gênica realizada por qPCR usando a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os genes avaliados foram: *Homeobox-leucine zipper protein* (Glyma16g02390); *Expansin-like B1-like* (Glyma17g15710); *Seed maturation protein PM34* (Glyma10g29630); *Hsp26/Hsp42* (Glyma14g11420); *Asparagine Synthetase* (Glyma11g27720) e Glyma11g16120. Letras maiúsculas (comparação entre cultivares dentro de regime hídrico) e minúsculas (comparação entre regime hídrico)

dentro de cultivares) iguais indicam que não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ;  $n = 9 \pm$  erro padrão da média). O eixo X (ordenada) representa a expressão relativa normalizada.

#### **6.4.3 Construção de plasmídeo com promotor induzido por déficit hídrico: gene repórter GUS e ensaio de expressão transiente**

Os plasmídeos construídos com os promotores dos genes *LTI* (Glyma20g29770), *Mat1* (Glyma07g10030), *Mat9* (Glyma09g31740), *HSP26/42* (Glyma14g11420) e Glyma11g16120, com gene repórter GUS e o terminador NOS foram sequenciados e após a verificação da sequência, a indução do gene GUS foi detectada por meio do sistema LUC:GUS. Como controles positivos foram utilizados o plasmídeo contendo o gene *Emerald Luc* (controle da reação) e um plasmídeo contendo o promotor do gene *Rd29B* (controle da análise) (Figura 4).

Dentre os plasmídeos testados, o promotor LTI foi aquele que apresentou maior ativação na presença de ABA, enquanto o Glyma11g16120 e o gene *HSP26/42* não apresentaram expressão nessas condições (Figura 4), o que é bem válido porque conforme a Tabela 1 o promotor do gene não caracterizado apresentou apenas dois *cis*-elementos putativo ABRE (resposta ao ácido absícico), cinco putativos sítios de reconhecimento de MYB e sete sítios de reconhecimento MYCs putativo (segundo dados do Plant Pan). O promotor do gene *HSP26/42* não foi analisado em função da ausência de sua sequência.

O promotor da construção com maior ativação, o LTI (Figura 4), apresentou em sua sequência *cis*-elementos putativos relacionados à resposta à seca como três ABRE, um ABF e 11 MYB e 10 MYC (Tabela 1 e Figura 4). Além desse promotor, também ocorreu a ativação de mais dois promotores, o *Mat9* e *Mat1* (Tabela 1 e Figura 4). Para o promotor *Mat9*, seis ABREs, oito MYBs e sete MYC putativos foram observados (Tabela 1 e Figura 4A). De forma semelhante, o promotor do gene *Mat1* apresentou cinco ABRE, sete MYB e cinco MYC como *cis*-elementos putativos de resposta à seca (Tabela 1 e Figura 4).

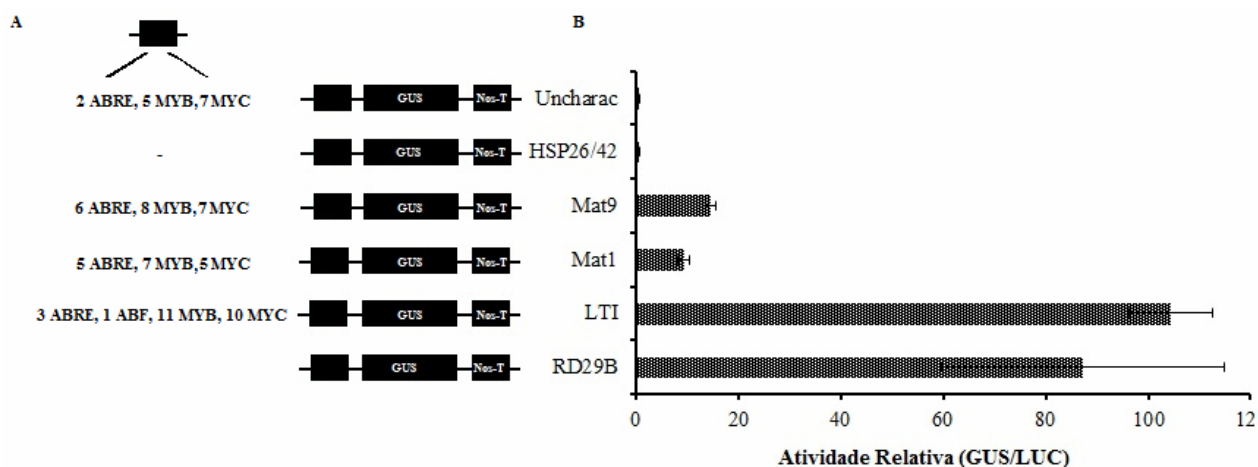


**Tabela 1.** *Cis*-elementos identificados em genes que foram altamente expressos em plantas de soja sob condições de déficit hídrico. Glyma09g31740 (Dehidrina Mat9); Glyma11g16120 (função desconhecida); Glyma07g10030 (Dehidrina Mat9); Glyma20g29770 (proteína LTI).

Glyma09g31740			Glyma11g16120			Glyma07g10030			Glyma20g29770		
<i>Cis</i> -elemento	Sítio	Sequência	<i>Cis</i> -elemento	Sítio	Sequência	<i>Cis</i> -elemento	Sítio	Sequência	<i>Cis</i> -elemento	Sítio	Sequência
ABRE-like	81	CACGT	ABRE-like	10	CACGT	ABRE-like	81	CACGT	ABFS	93	GCCAC
ABRE-like	87	CACGT	ABRELATERD	37	CACGT	ABRE-like	87	CACGT	ABRE-like	85	GCCAC
ABRE-like	88	CACGT	CGCGBOXAT	75	GCGC	ABRE-like	92	CACGT	ABRE-like	88	CACGT
ABRE-like	91	CACGT	MYB1At	12	AAACC	ABRELATERD	53	CACGT	ABRE-like	89	GACGT
ABRELATERD	48	ACGTG	MYB2CONSE	31	CCGTT	ABRELATERD	71	CACGT	LTRECOREAT	90	GTCGG
ABRELATERD	53	CACGT	MYB4	44	AACAA	LTRECOREA	16	CCGAC	MYB1AT	11	AAACC
MYB1At	32	TGGTT	MYB4	90	GTTTG	LTRECOREA	36	CCGAC	MYB1AT	59	TAACC
MYB1At	86	AAACC	MYBCORE	98	TAACC	MYCCONSEN	70	CAGGT	MYB2AT	52	TAACT
MYB1At	95	TGGTT	MYCCONSEN	10	CACGT	MYCCONSEN	80	CATTT	MYB2CONSE	1	CAACT
MYB2CONSE	38	CCGTT	MYCCONSEN	73	CAAGT	MYCCONSEN	81	CACGT	MYB2CONSE	56	CAACT
MYB4	28	ACCTA	MYCCONSEN	74	CAATT	MYCCONSEN	87	CACGT	MYB4	11	AACAA
MYB4	58	GGTTG	MYCCONSEN	76	CAAGT	MYCCONSEN	92	CACGT	MYB4	29	ACCTA
MYBCOREAT	36	CCGTT	MYCCONSEN	76	CATAT				MYB4	79	GTTTG
MYBCORE	25	TAACA	MYCCONSEN	77	CAAGT				MYBCORE	28	CTGTT
MYCCONSEN	59	CACTT	MYCCONSEN	83	CATTT				MYBCORE	32	CGGTT
MYCCONSEN	63	CAAAT							MYBCORE	90	CGGTT
MYCCONSEN	71	CAGAT							MYCCONSEN	1	CAACT
MYCCONSEN	81	CACGT							MYCCONSEN	56	CAACT
MYCCONSEN	87	CACGT							MYCCONSEN	57	CACTT
MYCCONSEN	88	CACGT							MYCCONSEN	66	CATCT
MYCCONSEN	91	CACGT							MYCCONSEN	70	CACTT
									MYCCONSEN	75	CATTT
									MYCCONSEN	88	CACGT

MYCCONSEN	88	CAAAT
MYCCONSEN	91	CACAT
MYCCONSEN	94	CACGT

---



**Figura 4. (A).** Cis-elementos responsivos ao ABA detectados pelos programas Plant Care e Plan Pan. (B). Atividade Relativa dos plasmídeos analisados (expressão do plasmídeo efetor induzido por ABA e comparado com a expressão do mesmo plasmídeo em etanol) por ensaio transiente realizado em protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. O experimento foi realizado em triplicata, SD = 3. Os protoplastos foram co-transfectados com o plasmídeo Emerald Luc, utilizado como normalizador da eficiência da transfecção, e com as construções efetoras. O plasmídeo com o promotor RD29B foi utilizado como controle do experimento. HSP26/42, *Heat Shock Protein 26/42*; Mat9, *Maturation associated protein 9*; Mat1, *Maturation associated protein 1*, LTI *Low Temperature Induced*; GUS,  $\beta$ -glucuronidase; Nos-T, *Nopaline synthase terminator*.

#### 6.4.4 Análise pelo Genevestigator

A atividade transcricional desses promotores foi avaliada *in silico* com auxílio do Genevestigator para testar outras condições de estresses bióticos e abióticos, outros estádios de desenvolvimento e em diversas partes anatômicas. De uma forma geral, os genes que apresentaram alta expressão (up regulados) ou foram reprimidos tiveram o mesmo perfil, apresentando pequenas diferenças, como intensidade de expressão nos estresses bióticos e abióticos e expressões diferenciais nas demais características descritas detalhadamente para cada gene (Figura 5).

O promotor que apresentou pequena indução ao ABA (Glyma11g16120), segundo o genevestigator, mostrou baixa expressão em condições de estresses abióticos como por exemplo os ambientes com excesso de alumínio e magnésio, além de meio alcalino (12h). Além destes estresses, este gene também apresentou

baixa expressão no crescimento de brotos (Figura 5A). Por outro lado, também foi detectada alta expressão desse gene em estresses abióticos mas sob diferentes agentes estressores tais como alumínio e meio alcalino (0,5 h) (Figura 5A). Com relação aos diferentes órgãos, a expressão do Glyma11g16120 foi maior em raízes, pêlos radiculares e hipocótilo, assim como no desenvolvimento do grão (Figura 5C e 5B).

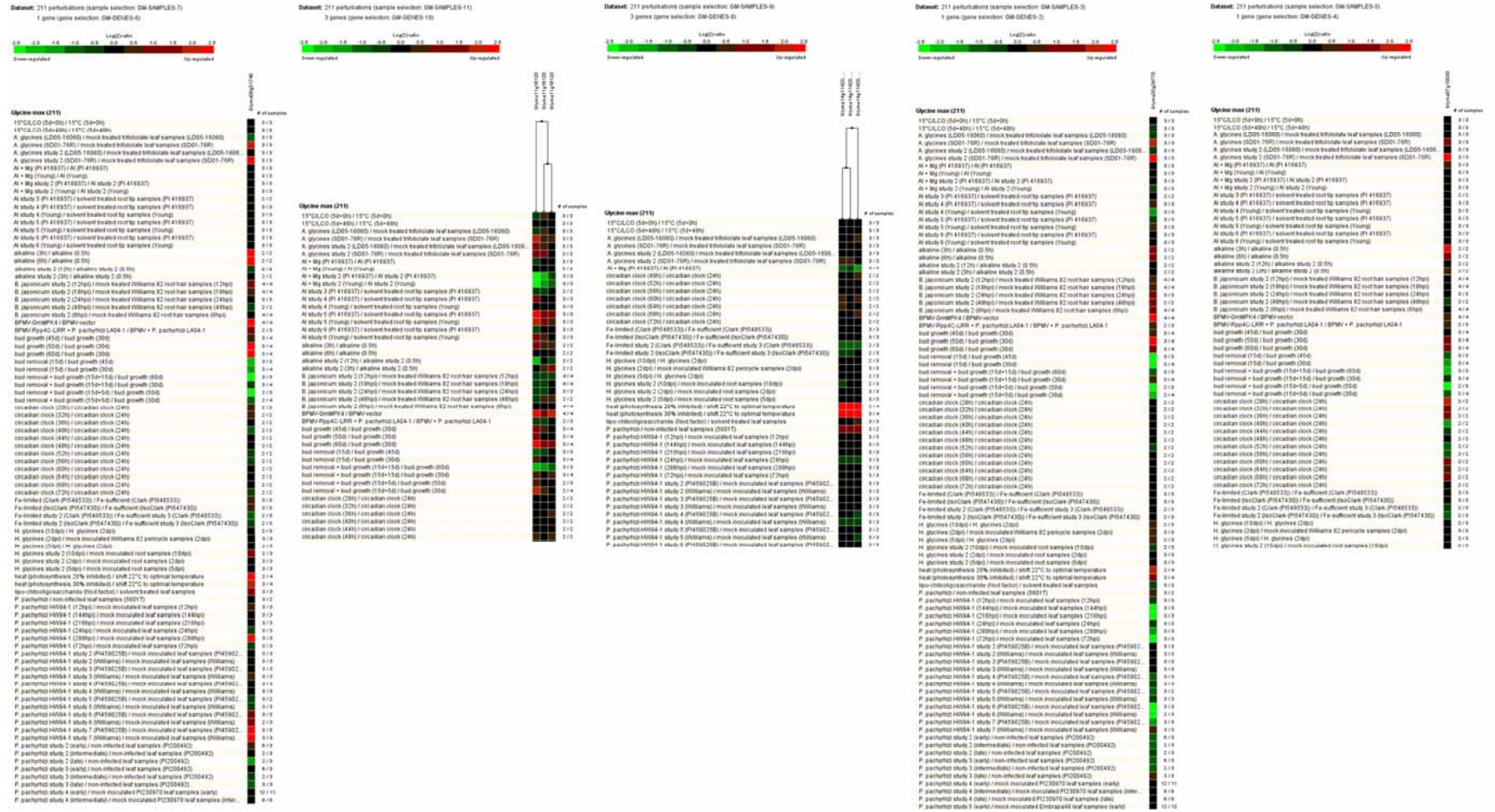
O promotor do gene *HSP26/42* apresentou baixa indução no ensaio de expressão transiente e alta expressão de genes similares ao Glyma11g16120, além de apresentar baixa indução em amostras sob estresse por temperatura (Figura 5A). Quanto às partes anatômicas, uma alta expressão foi identificada principalmente em folhas unifoliolares, mas também detectadas em sementes, pêlos radiculares, hipocótilo, cotilédone, raízes e ápice radicular (Figura 5C). O promotor *HSP26/42* apresentou ainda expressão diferencial principalmente no desenvolvimento de grãos, mas também na germinação (Figura 5B).

O plasmídeo que apresentou maior ativação entre todos aqueles testados continha o promotor do gene LTI (Glyma20g29770), o qual apresentou superexpressão do gene em tecido de pêlos radiculares e menor expressão em meio alcalino, mudança da temperatura de 22°C para a temperatura ótima de crescimento, hipocótilo, no ápice de raízes em contato com solventes (Figura 5A). Considerando-se o estágio de desenvolvimento, a expressão do promotor foi predominante no crescimento do broto (Figura 5C). Com relação às partes anatômicas, a maior expressão ocorreu na região da testa em semente, seguindo uma escala decrescente em sementes, pêlos radiculares, cotilédones, folha unifoliolar e na lâmina das folhas. Para o estágio de desenvolvimento, foi observado maior expressão no desenvolvimento dos grãos (Figura 5C).

Além do LTI, um dos plasmídeos que também apresentou alta ativação do GUS foi o que continha o promotor do gene Mat9 (Glyma09g31740), cuja superexpressão foi detectada em folhas trifolioladas, pêlos radiculares, raízes, ápices de raízes tratadas com solvente, meio alcalino, crescimento do broto e mudanças de temperatura. Por sua vez, as condições em que foram observadas baixa expressão foram o crescimento do broto e no ciclo circadiano (Figura 5A). No estágio de desenvolvimento esse gene apresentou expressão em 76 amostras responsáveis pelo desenvolvimento do grão (frequência de expressão próxima de

100%). Já nas partes anatômicas foi encontrada essa mesma frequência em 64 e 6 amostras de sementes e cotilédones respectivamente, e ainda apresentou alta porcentagem de expressão em pêlos radiculares e testa.

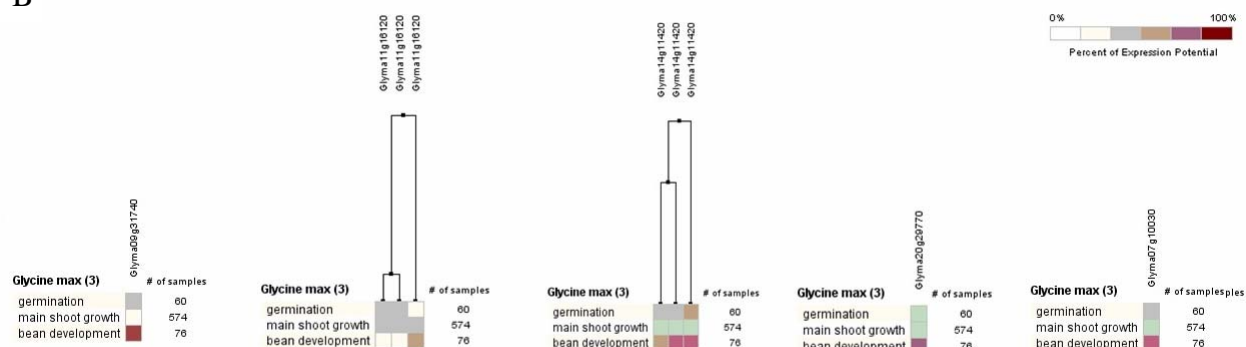
O plasmídeo do gene que transcreve e traduz a proteína Mat1 (Glyma07g10030), mostrou ativação em condições de concentração de ABA no ensaio de expressão transiente (Figura 4B). A superexpressão foi identificada ainda em amostras submetidas a meio alcalino e genes do ciclo circadiano; e menor expressão em genes de resposta ao crescimento do broto, ciclo circadiano e estudo de suficiência de ferro (Figura 5A). Em relação às partes anatômicas, as folhas unifoliolares apresentaram a maior porcentagem de potencial de expressão, seguidos de pêlos radiculares, semente e cotilédone e lâmina foliar. A maior porcentagem de potencial de expressão nos estádios de desenvolvimento foi no desenvolvimento do grão (Figura 5C).



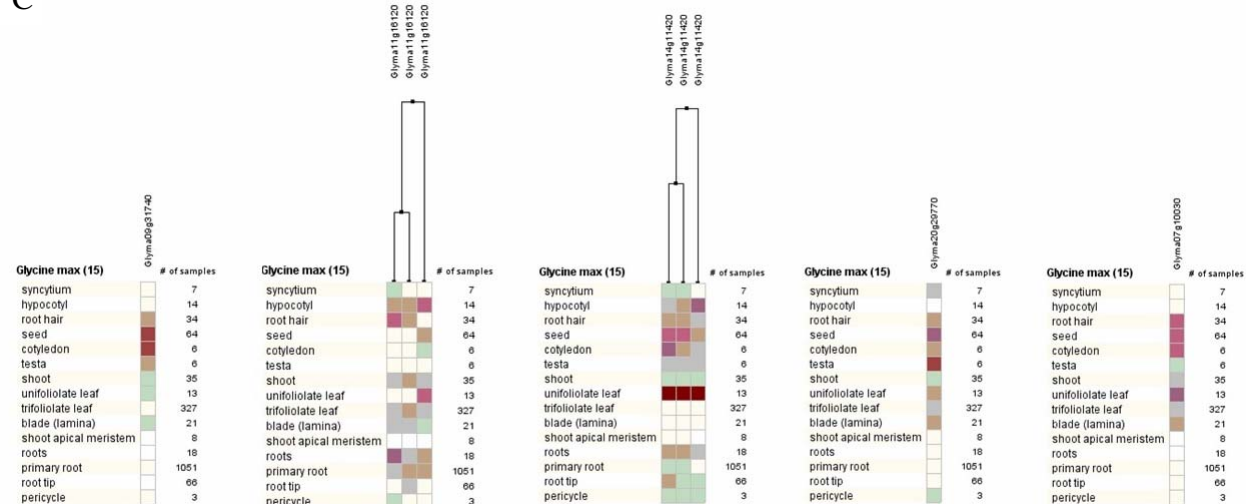
**Figura 5.** Análise de promotores. Os *Glyma09g31740* (*Mat9*); *Glyma11g16120*; *Glyma14g11420* (*HSP26/42*); *Glyma20g29770* (*LT1*) e *Glyma07g10030* (*Mat1*) foram submetidos ao Genevestigator para prever, *in silico*, a expressão diferencial destes genes

em diferentes condições adversas. (A) comparação sob estresses abióticos e bióticos; (B) quanto ao estágio de desenvolvimento; (C) em diferentes partes anatômicas.

B



C



**Figura 5.** Análise de promotores. Os Glyma09g31740 (*Mat9*); Glyma11g16120; Glyma14g11420 (*HSP26/42*); Glyma20g29770 (*LTI*) e Glyma07g10030 (*Mat1*) foram submetidos ao Genevestigator para prever, *in silico*, a expressão diferencial destes genes em diferentes condições adversas. (A) comparação sob estresses abióticos e bióticos; (B) quanto ao estágio de desenvolvimento; (C) em diferentes partes anatômicas.

## 6.5 DISCUSSÃO

Os perfis de transcrição demonstraram que a classe das proteínas LEA e desidrinas foram as mais expressas no déficit hídrico moderado e principalmente no severo (Figura 2). Os dados obtidos para estas classes foram similares aos descritos por Maruyama et al. (2012), os quais também identificaram uma maior repressão de genes relacionados à fotossíntese. Os resultados obtidos por estes autores para a cultivar de soja Nourin2, arroz e *Arabidopsis* sob déficit hídrico, referem-se às mesmas classes de genes identificadas no presente estudo, apresentando os mesmos perfis de regulação up e down regulados (Figura 2).

As proteínas LEA, assim como as desidrinas, possuem papéis como estabilizador de membranas e proteína, antioxidantes ou ainda como protetores que previnem o colapso celular em baixas quantidades de água (Tunnacliffe & Wise, 2007) e, portanto, têm sido associadas à tolerância celular à desidratação (Hundertmark & Hinch, 2008). De uma forma geral, os diferentes perfis espaciais das proteínas LEA refletem as muitas famílias desses genes *LEA* no genoma e, particularmente, o grupo das desidrinas, o qual possui função de proteção celular e prevenção de perda da água intracelular durante a desidratação (Hanin et al., 2011). No grupo IV das proteínas LEA encontra-se a LEA18, que tem papel funcional no transporte de vesículas celulares (Hundertmark et al., 2011). Além dessas funções, algumas proteínas LEA são IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins*), como a ERD14, que se liga a vesículas de fosfolípidios e age contra agregação térmica da citrato sintase (EC 2.3.3.1), firefly luciferase (EC 1.13.12.7), na inativação da álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) e da lisozima (EC 3.2.1.17) (Kovacs et al., 2008).

O menor metabolismo da fotossíntese é um dos principais afetados pelo déficit hídrico. Isso ocorre porque durante esta condição adversa a diminuição do CO<sub>2</sub> interno, resultante do fechamento estomático, faz com que as enzimas da fotossíntese e da síntese de ATP sejam inibidas (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorec 2007; Zlatev & Lidon, 2012). Assim, comumente os genes que transcrevem essas enzimas passam a ter menor transcrição, já que a maquinaria da célula gasta sua energia na produção de moléculas de proteção ao déficit hídrico.

Outras classes que demonstraram uma alta taxa de expressão gênica foram ubiquitinização, metabolismo de outros aminoácidos, genes de epigenética e de

metabolismo de lipídios (Figura 2). A alta expressão de genes relacionados ao processo de ubiquitinação, em eucariotos, resulta de processos de resposta à adaptação a vários estresses ambientais e também em resposta ao estímulo de desenvolvimento desses organismos, uma vez que a rota de ubiquitinação atua na degradação de proteínas alvo e na modificação pós-transcricional (Liu et al., 2011).

O aumento dos genes de metabolismo de aminoácidos também está relacionado à tolerância a estresses abióticos (Figura 2). O conteúdo destes metabólitos aumentam em condições de déficit hídrico em decorrência da expressão de vários genes responsáveis principalmente pelo acúmulo de aminoácidos (prolina e asparagina), maiores responsáveis pela proteção das plantas, além da acumulação de aminas (poliaminas e glicina betaína) e açúcares (trealose, sorbitol e manitol) (Planchet et al., 2011).

No presente estudo também foram identificados aumentos de níveis de expressão dos genes envolvidos na epigenética. Conforme Gutzart & Scheid (2012), esses genes são também essenciais na resposta vegetal ao déficit hídrico e aos demais estresses bióticos e abióticos. Existem evidências crescentes na literatura científica de que o silenciamento gênico transcricional e pós transcricional são devidos, em parte, pela ação de RNAs não codificantes e siRNAs (*small interference RNA*) e proteínas geradas ou ligadas a eles (Gutzart & Scheid, 2012). Em *Craterostigma plantagineum*, Hilbricht et al. (2008) relataram um siRNA que regulou uma resposta adaptativa dessa planta de ressurreição em condições de desidratação. Além disso, a regulação epigenética pode ser observada em resposta aos estresses abióticos pela modificação das histonas ou metilação de DNA que remodelam a cromatina (Berger, 2007; Chinnusamy & Zhu, 2009; Hirayama & Shinozaki, 2010). Segundo Lish (2009), sob estresses abióticos a mudança da metilação de DNA e a re-localização de elementos de DNA móveis, provoca alterações na organização do cromossomo e na expressão gênica, alterando os perfis de expressão gênica.

Os resultados de expressão gênica para validação dos dados de microarranjo mostram que o gene codificador da proteína *Homeobox-leucine zipper protein* (Figura 3) foi superexpresso em ambos os déficits, porém com maior expressão ao sexto dia após a suspensão da irrigação. De acordo com a anotação GO (Gene Ontology), este gene possui atividade de fator de transcrição e resposta à privação

de água, e, segundo a descrição no Phytozome (<http://www.phytozome.net>) e NCBI (ATHB7-like *National Center for Biotechnology Information*) possui função *Homeobox-leucine zipper protein*. Segundo Zahur et al. (2013), proteínas homeodomínios zíper de leucina têm sido identificadas em diversas espécies como a soja e estes fatores de transcrição HD Zip (*Homeodomain associated leucine zipper proteins*) seriam expressos em condições adversas de iluminação e seca. Em *Arabidopsis*, proteínas HD Zip foram induzidas e, assim como na soja, auxiliam na resposta vegetal à seca, provavelmente através da ativação de genes de respostas a desidratação via rotas de sinalização ABA-dependente ou independente (Zahur et al., 2013). Manavella et al (2006) inseriram o fator de transcrição Hahb-4 de *Helianthus annuus* (girassol), membro da subfamília HD Zip 1, em *A. thaliana* e observaram que as plantas transgênicas superexpressaram esse fator de transcrição aumentando sua tolerância ao déficit hídrico. Em girassol esse fator de transcrição é regulado pela disponibilidade de água e ABA.

O Glyma17g15710 também foi superexpresso em todos os tratamentos (Figura 3). Caracterizado com termos GOs de sistema de endomembrana, parede celular e afrouxamento de parede celular, é, segundo o NCBI, uma expansina (*Expansin-like B1-like*) e pelo Phytozome um gene pólen alergênico. As expansinas são proteínas envolvidas na modificação da parede celular, responsáveis pelo afrouxamento da parede celular no momento do alongamento celular. São codificadas por uma grande família gênica que consiste de  $\alpha$ -*expansin*,  $\beta$ -*expansin*, *expansin-like A* e *expansin-like B*. Sob baixa pressão de turgor, como ocorre no déficit hídrico, a expressão desse gene promoveria o relaxamento da parede celular mantendo o crescimento e espessura celular (Skirycz & Inzé, 2010). A expansina também está envolvida no crescimento celular em plantas de trigo submetidas ao déficit hídrico (Zhao et al., 2012) e em tabaco como demonstrado pelo estudo de Li et al., (2011) que superexpressou o gene de expansina *TaEXPB23* e observou maior tolerância a seca.

Outro gene expresso em ambos os tratamentos, o Glyma10g29630 (Figura 3) está relacionado a processos metabólicos, ligante e com atividade oxireductase. Esse gene transcreve uma proteína de maturação de semente chamada PM34 e foi diferencialmente regulado apresentando aumento da expressão no decorrer do crescimento das sementes em vagens de soja (Thibaud-Nissen et al., 2003; Asakura

et al., 2012).

No presente estudo, o Glyma14g11420 foi superexpresso apenas no estresse moderado (Figura 3) e possui termos GOs de citoplasma e resposta ao estresse. É uma proteína de choque térmico de baixo peso molecular (17.9 kDa class II heat shock protein-like\_NCBI, Hsp26/Hsp42\_Phytozome). Em *Arabidopsis*, a superexpressão desse gene pode contribuir para o acúmulo de fatores de defesa ao déficit hídrico como açúcares solúveis, prolina livre (Xue et al., 2009) e proteínas de defesa (Xue et al., 2010). De uma forma geral, a expressão de genes *HSPs* é um mecanismo que aumenta a tolerância a estresses porque melhoram o uso eficiente da água e de nutrientes além de aumentar a estabilidade de membranas e hidratação celular (Lipiec et al., 2013).

Outro gene superexpresso em ambas as condições de déficit hídrico no presente estudo, o Glyma11g27720 (Figura 3), é transcrito e traduzido em uma asparagina sintase [EC 6.3.5.4] e possui termos GOs associados ao processo de biossíntese de asparagina e do processo metabólico da glutamina. Sabe-se que a asparagina sintase é essencial ao metabolismo primário do nitrogênio por ser uma enzima chave na produção deste aminoácido (Hwang et al., 2011). Além de ser a principal forma de transporte e estoque de nitrogênio, a asparagina é um aminoácido que atua como osmólito acumulando-se durante estresses osmóticos como seca e salinidade (Legay et al., 2011).

Uma vez validados, os genes escolhidos foram submetidos a uma busca por putativos *cis*-elementos envolvidos na resposta à seca, em suas sequências promotoras. Os elementos identificados foram ABRE, MYC e MYB, presentes na rota dependente de ABA (Tabela 1) e induzidos por ele. Este hormônio, essencial na resposta ao déficit hídrico, é produzido quando a planta percebe a falta de água no solo por meio da diminuição do potencial hídrico. Assim, os tecidos vasculares da folha sintetizam o ABA e o transportam por meio de transportadores ou por gradientes de pH (Seo & Koshiba, 2011) para as células-guarda onde desencadeiam o fechamento dos estômatos (Osakabe et al., 2013), uma das principais e mais características respostas das plantas à seca. Esse aumento de ABA também induz a expressão de diversos genes que possuem na sua região promotora *cis*-elementos de resposta ao ABA (ABRE) (Osakabe et al., 2013) que desencadeiam mecanismos de respostas iniciais às condições de privação de água. Segundo Yamaguchi-

Shinozaki & Shinozaki (2006), para que haja a expressão de genes de resposta ao déficit hídrico presentes na rota do hormônio ABA é necessário mais de um *cis*-elemento ABRE (ABA-responsive element), o que não foi observado no promotor do Glyma11g16120, ou ainda que tenham elementos de acoplamento (CE coupling element) nas regiões promotoras (Tabela 1), o que também não foi encontrado nesse promotor e portanto, poderia ser a causa da baixa indução desse gene detectada no ensaio de expressão transiente (Figura 4).

Os genes que apresentaram maior indução ao ABA no ensaio de expressão transiente (Figura 4) apresentaram mais de dois putativos *cis*-elementos ABREs (Tabela 1), o que provavelmente poderia ser a causa do alto nível de indução (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Outros *cis*-elementos dependentes de ABA como MYBs e MYCs também foram identificados na sequência deste promotor (Tabela 1). Estes *cis*-elementos foram identificados no promotor do gene *RD22* por Abe et al. (2003) e, além deles, existem outros *cis*-elementos nas regiões promotoras dos genes de resposta à seca que estão na cascata ABA dependente como o NACR, encontrado pela primeira vez no gene *RD26* (Fujita et al., 2004), regulador de genes de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Specie*), *cis*-elementos de ligação ao NFYA (*Nuclear Factor Y*) (Mantovani, 1999), entre outros.

Na região promotora do gene *LTI*, o qual apresentou maior indução na presença de ABA, (Figura 4), foram identificados os putativos *cis*-elementos ABREs, MYBs e MYCs (Tabela 1), sítios de fatores de transcrição que possuem importantes papéis na resposta tardia ao estresse, como observado pela transcrição de genes da cascata desses FTs depois do acúmulo de ABA endógeno (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Os outros promotores que apresentaram indução pelo ensaio de expressão transiente também apresentaram *cis*-elementos putativos ABRE e sítios de reconhecimento MYB e MYC (Tabela 1), o que provavelmente pode ser a causa da menor indução dos mesmos quando comparado ao promotor de *LTI* (Figura 4).

Assim, os resultados das análises realizadas no Genevestigator (Figura 5) demonstraram que os promotores apresentaram expressão em condições de estresses abióticos e bióticos, além de serem encontrados nos grãos e ter expressão em diferentes estádios de desenvolvimento. Isso ocorre porque os promotores são regiões regulatórias de cada gene e possuem diversos *cis*-elementos que são um

dos responsáveis por essa expressão diferencial, o que faz com que rotas transcricionais regulatórias possam se cruzar (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

Esses resultados sugerem que os promotores dos genes *LTI* (Glyma20g29770), *Mat1* (Glyma07g10030) e *Mat9* (Glyma09g31740) podem ser utilizados como promotores na obtenção de plantas transgênicas cuja transformação tenha por objetivo a expressão de genes relacionados às condições específicas de desidratação (indução por ABA) e para os outros estresses, tecidos e estádios de desenvolvimento específicos, ou seja, poderão ser utilizados na obtenção de PGMs.

## 6.6 CONCLUSÕES

Os promotores dos genes *LTI*, *Mat1* e *Mat9* são responsivos ao déficit hídrico e podem ser utilizados como estresse induzidos em condições de déficit hídrico, em estudos que visem à obtenção de construções gênicas contendo genes de interesse cuja expressão ative respostas às condições de desidratação, solventes de alumínio e estresse por altas temperaturas. Contudo, análises *in vivo* devem ser realizadas nessas condições específicas para corroborar os resultados.

## 6.7 REFERÊNCIAS

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell Online*. 9: 1859–68.
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell Online*. 15: 63–78.
- Arasimowicz M & Floryszak-Wieczorek J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*. 172: 876-887.
- Asakura T, Tamura T, Terauchi K, Narikawa T, Yagasaki K, Ishimaru Y, Abe K (2012) Global gene expression profiles in developing soybean seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 147-153.
- Benjamini Y & Hochberg Y (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society B*. 57: 289 -300.
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447: 407–412.
- Bioinformatics Evolutionary Genomics  
(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).
- Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, RL Pan (2008) PlantPAN: Plant Promoter Analysis Navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group. *BMC Genomics*. 9: 561.

- Chinnusamy V & Zhu JK (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 133–139.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 1723–30.
- Devi MJ, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK, Serraj R, Anwar SY, Vadez V (2011) Relationships between transpiration efficiency and its surrogate traits in the *rd29A: DREB1A* transgenic lines of groundnut. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 197: 272–283.
- Eddy SR (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*. 14: 755–63.
- Engels C, Fuganti-Pagliarini R, Marin SRR, Marcelino-Guimarães FC, Oliveira MCN, Kanamori N, Mizoi J, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K & Nepomuceno, AL (2013) Introduction of the *rd29A: AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. *Genetics and Molecular Biology*. 36: 556–565.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pernnigton JS (1971) Stage of development description for soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Crop Science*. 11: 929–931.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LSP, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*. 39: 863–76.
- Gao SQ, Chen M, Xia LQ, Xiu HJ, Xu ZS, Li LC, Zhao CP, Cheng XG, Ma YZ (2009) A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, *GhDREB*, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. *Plant Cell Reports*. 28: 301–311.
- Genevestigator\_ <https://www.genevestigator.com/gv>.
- Gutzat R & Scheid OM (2012) Epigenetic responses to stress: triple defense? *Current Opinion in Plant Biology*.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1503–1509.
- Hilbricht T, Varotto S, Sgaramella V, Bartels D, Salamini F, Furini A (2008) Retrotransposons and siRNA have a role in the evolution of desiccation tolerance leading to resurrection of the plant *Craterostigma plantagineum*. *New Phytologist*. 179: 877–887.
- Hirayama T & Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*. 61: 1041–1052.
- Hundertmark M & Hinch DK. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*. 9: 118.
- Hundertmark M, Dimova R, Lengefeld J, Seckler R, Hinch DK (2011) The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from *Arabidopsis thaliana* modulates membrane stability through binding and folding. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 446–453.
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn N, Kelly E, Laugraud A, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, Mistry J, Mitchell A, Mulder N, Natale D, Orengo C, Quinn AF, Selengut JD, Sigrist CJA, Thimma M, Thomas PD, Valentin F, Wilson D, Wu CH, Yeats C (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*. 37: D211–D215.

- Hwang IS, An SH & Hwang BK (2011) Pepper *asparagine synthetase 1* (*CaAS1*) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *The Plant Journal*. 67: 749-762.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*. 47: 141-153.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant and Cell Physiology*. 45: 346-350.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*. 147: 381-390.
- Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Ham LH, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. *PLOS One*. 7: 1-10.
- Legay S, Lefèvre I, Lamoureux D, Barreda C, Luz RT, Gutierrez R, Quiroz R, Hoffmann L, Hausman JF, Bonierbale M, Evers D, Schafleitner R (2011) Carbohydrate metabolism and cell protection mechanisms differentiate drought tolerance and sensitivity in advanced potato clones (*Solanum tuberosum* L.). *Functional & Integrative Genomics*. 11: 275-291.
- Li F, Xing S, Guo Q, Zhao M, Zhang J, Gao Q, Wang G, Wang W (2011) Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*. 168: 960-966.
- Lim CJ, Lee HY, Kim WB, Lee BS, Kim J, Ahmad R, Kim HA, Yi SY, Hur CG, Kwon SY (2012) Screening of tissue-specific genes and promoters in tomato by comparing genome wide expression profiles of *Arabidopsis* orthologues. *Molecules and cells*. 34: 53-59.
- Lipiec J, Doussan C, Nosalewicz A, Kondracka K (2013) Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*. 27: 463-477.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 10: 1391-1406.
- Liu YC, Wu YR, Huang XH, Sun J, Xie Q (2011) *AtPUB19*, a U-Box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 4: 938-946.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LSP, Nguyen HT (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant and Cell Physiology*. 50: 1260-1276.
- Manavella PA, Arce AL, Dezar CA, Bitton F, Renou JP, Crespi M, Chan RL (2006) Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb4 transcription factor. *The Plant Journal*. 48: 125-137.

- Mantovani, R (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*. 239: 15–27.
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yohisda T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshiwara K, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Identification of *cis*-acting promoter elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in Arabidopsis, rice, and soybean. *DNA Research*. 19: 37–49.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 27: 29-34.
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2013) ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*.
- Planchet E, Rannou O, Ricoult C, Boutet-Mercey S, Maia-Grondard A, & Limami AM (2011) Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both abscisic acid (ABA)-dependent and independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination. *Journal of Experimental Botany*. 62: 605-615.
- Polizel AM, Medri ME, Nakashima K, Yamanaka N, Farias JRB, Oliveira MCN, Marin SRR, Abdelnoor RV, Marcelino-Guimarães FC, Fuganti R, Rodrigues FA, Stolf-Moreira R, Beneventi MA, Rolla AAP, Neumaier N, Yamaguchi-Shinozaki K, Carvalho JFC, Nepomuceno AL (2011) Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with *rd29A: AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genetics and Molecular Research*. 10: 3641-3656.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki (2008) Arabidopsis DREB2A interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell Online*. 20: 1693–1707.
- Quackenbush J (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*. 32: 496-501.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*. 33 (Web Server issue). W116-W120.
- Rogers SO & Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*, vol. A6. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1–10.
- Saad RB, Romdhan WB, Zouari N, Azaza J, Mieulet D, Verdeil JL, Guiderdoni E, Hassairi A (2011) Promoter of the *AISAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus litoralis* directs developmental-regulated, stress-inducible, and organ-specific gene expression in transgenic tobacco. *Transgenic Research*. 20: 1003-1018.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell Online*. 18: 1292-1309.
- Sakurai N, Ara T, Ogata Y, Sano R, Ohno T, Sugiyama K, Hiruta A, Yamazaki K, Yano K, Aoki K, Aharoni A, Hamada K, Yokoyama K, Kawamura S, Otsuka H, Tokimatsu T, Kanehisa M, Suzuki H, Saito K, Shibata D (2011) KaPPA-View4: a metabolic pathway database for representation and analysis of correlation networks of gene co-expression and metabolite co-accumulation and omics data. *Nucleic*

- Acids Research*. 39: D677–84.
- Seo M & Koshiba T (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *Journal of Plant Research*. 124: 501–507.
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 58: 221–227.
- Skirycz A & Inzé D (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 197–203.
- Stolf-Moreira R, Lemos EGM, Abdelnoor RV, Beneventi MA, Rolla AAP, Pereira SS, Oliveira MCN, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC (2011) Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*. 46: 58–65.
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*. 132: 118–136.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *The Plant Cell Online*. 16: 2481–98.
- Tunnacliffe A & Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*. 94: 791–812.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) 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 – USA*. 97: 11632 – 11637.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An Arabidopsis *myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell Online*. 5: 1529–1539.
- Valente MAS, Faria JAQA, Soares-Ramos JRL, Reis PAB, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MAO, Fietto LG, Loureiro ME, Aragão FJL, Fontes EPB (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 60: 533–546.
- Ware D, Jaiswal P, Ni J, Pan X, Chang K, Clark K, Teytelman L, Schmidt S, Zhao W, Cartinhour S, McCouch S, Stein L (2002) Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Research*. 30: 103–105.
- Whalley HJ, Sargeant AW, Steele JF, Lacoere T, Lamb R, Saunders NJ, Knight H, Knight MR (2011) Transcriptomic analysis reveals calcium regulation of specific promoter motifs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*. 23: 4079–4095.
- Xue Y, Peng R, Xiong A, Li X, Zha D, Yao Q (2009) Yeast heat-shock protein gene *HSP26* enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 166: 844–850.
- Xue Y, Peng R, Xiong A, Li X, Zha D, Yao Q (2010) Over-expression of heat shock protein gene *hsp26* in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance. *Biologia Plantarum*. 54: 105–111.
- Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 781–803.
- Yi N, Kim YS, Jeong MH, Oh SJ, Jeong JS, Park SH, Jung H, Choi YD, Kim JK

- (2010) Functional analysis of six drought-inducible promoters in transgenic rice plants throughout all stages of plant growth. *Planta*. 232: 743-754.
- Yoo Sang-Dong, Young-Hee Cho, and Jen Sheen (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*. 2: 1565-1572.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki, K (2010) 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*. 61: 672-685.
- Zahur M, Asif MA, Zeeshan N, Mehmood S, Malik MF, Asif AR (2013) Homeobox leucine zipper proteins and cotton improvement. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 15-20.
- Zhang P, Dreher K, Karthikeyan A, Chi A, Pujar A, Caspi R, Karp P, Kirkup V, Latendresse M, Lee C, Mueller LA, Muller R, Rhee SY (2010) Creation of a genome-wide metabolic pathway database for *Populus trichocarpa* using a new approach for reconstruction and curation of metabolic pathways for plants. *Plant Physiology*. 153: 1479–1491.
- Zhao MR, Han YY, Feng YN, Li F, Wang W (2012) Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Reports*. 31: 671-685.
- Zlatev Z & Lidon FC (2012) An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 24: 57-72.

**Tabela Suplementar 1.** Sequência de iniciadores (Forward e Reverse) dos genes-alvo e gene referência utilizados nas reações de RT-qPCR.

Gene	Database	Iniciador F	Iniciador R
<i>Homeobox-leucine zipper protein</i>	Glyma16g02390	5' ACCAAACTCACCTATAACCCTC 3'	5' CTCCACAAAATTTTGGTTATTG 3'
<i>Expansin-like B1-like (Pollen allergen)</i>	Glyma17g15710	5' TCACTACTAATCACTTGCTGC 3'	5' GAGACACACAACAGTACA 3'
<i>Seed maturation protein PM34 17.9 kDa class II heat shock protein-like (Hsp26/Hsp42)</i>	Glyma10g29630	5' TCCAACACTACATTTCTTCCACC 3'	5' AAAGACACGTTTTCTTAGG
<i>Asparagine Synthetase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.4]</i>	Glyma14g11420	5' CAGCAAACAAACAAACCAG 3'	5' AACCATTGCTTTGAGAACAG 3'
<i>Uncharacterized rRNA18S</i>	Glyma11g27720	5'ACTCTTTCAACTTGGAACCC 3'	5' AGACAAGATGTGGATGGA 3'
	Glyma11g16120	5' TAGTTGTCAACACCACCCAT 3'	5' TTGTGCAAATAATCACTAGC 3'
		5'GGTTGACAGACTGAGAGCTCTTTC 3'	5'CAAATCGCTCCAACACTAAGA 3'

## Capítulo III

### 7 Identificação de marcadores moleculares de expressão em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico e à alta temperatura

#### 7.1 RESUMO

A soja é um dos principais produtos brasileiros de exportação e seu complexo é responsável pelo equilíbrio na balança comercial nacional. Porém, fatores abióticos como déficit hídrico e altas temperaturas, podem comprometer o crescimento e desenvolvimento da cultura, limitando a produtividade final. Muitos esforços de pesquisa científica têm se concentrado no desenvolvimento de estratégias para a obtenção de plantas mais tolerantes a tais estresses. Neste contexto, a identificação de marcadores moleculares de expressão, robustos e cujo produto seja facilmente mensurado, torna-se uma ferramenta vantajosa no âmbito do melhoramento vegetal. No presente trabalho, visando identificar marcadores de expressão para déficit hídrico e altas temperaturas na cultivar tolerante Embrapa 48, a expressão de genes codificadores para desidrinas, proteínas de choque térmico (HSPs), proteína LEA18, transaldolase (EC 2.2.1.2) e proteína ligante ao cálcio (calmodulina) foi quantificada por qPCR em folhas, caules e raízes de soja, submetidas a estresses isolados e combinados de déficit hídrico e alta temperatura. Os resultados indicaram um maior número de marcadores de expressão em folhas da cultivar tolerante Embrapa 48 no tratamento de déficit hídrico e estresse por alta temperatura combinados. Os genes marcadores de expressão no déficit hídrico em folha foram *HSP18.2* (Glyma14g06900, XP\_003519372), *HSP70* (Glyma17g08020) e *CaM* (Glyma13g09550), em caules *Mat9* (Glyma09g31740, NP\_001238185) e em raízes *LEA18* (Glyma17g17860). No estresse por alta temperatura, os possíveis marcadores de expressão em folhas foram *HSP70* e transaldolase-like, em caules transaldolase e em raízes *LEA18*. Os marcadores de expressão *Mat9* e *HSP70* foram identificados nos tratamentos combinados em folhas, transaldolase-like em caules e *LEA18* em raízes. Esses resultados indicam que os referentes genes são úteis na identificação de tolerância em cultivares de soja.

**Palavras-chaves:** genes-alvo, seca, calor, desidratação, resposta ao estresse.

## 7.2 INTRODUÇÃO

As adversidades ambientais às quais a cultura da soja está sujeita têm sido um desafio para a expansão das fronteiras agrícolas das regiões com alto potencial de produtividade. Dentre estes fatores adversos, a seca, que pode variar em duração, tempo e intensidade (Passioura, 2012), é um dos principais elementos abióticos que afetam o crescimento e desenvolvimento da soja (Manavalan et al., 2009), sendo responsável por grandes perdas de produtividade.

De acordo com Manavalan et al. (2009), quando cultivares que apresentam algum nível de tolerância à seca são analisadas, características importantes como morfologia e plasticidade de raízes, condutância estomática, condutância da epiderme, densidade da pubescência foliar, eficiência do uso de água e ajuste osmótico da parte aérea deveriam ser consideradas. Ainda, a captura de água disponível no solo e seu melhor uso efetivo são características essenciais para sobrevivência a déficits hídricos prolongados e consequente redução da perda de produtividade (Passioura, 2012).

Na busca por características de tolerância à seca a realização de estudos agronômicos (Rolla et al., 2013), fisiológicos (Capítulo 1) e moleculares (Polizel et al., 2011) acrescentam diferentes perspectivas e informações sobre o comportamento das plantas em tal condição. Passioura (2012) afirma que uma das aplicações da informação fenotípica no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca é o desenvolvimento de ferramentas de seleção, preferencialmente marcadores moleculares robustos, que sejam facilmente quantificados nas características morfológicas, de desenvolvimento e fisiológicos. A descoberta de marcadores de expressão foi favorecida com o desenvolvimento das técnicas de Microarranjos de DNA, que possibilita a identificação de centenas de genes, de diferentes cultivares, expressos em condições de déficit hídrico, e dessa maneira possibilita a identificação de marcadores de expressão gênica (Badicean et al., 2011).

Estudos com marcadores de expressão e moleculares em condições de déficit hídrico e estresse por alta temperatura vêm sendo realizados em diversas culturas. Em milho (Badicean et al., 2011), grão de bico (Varshney et al., 2009) e soja (Neves-Borges et al., 2012) as respostas ao déficit hídrico foram analisadas e

em trigo (Al-Doss et al., 2011) e arroz (Ye et al., 2012) as respostas de estresse por alta temperatura. Neves-Borges et al. (2012) utilizaram duas cultivares contrastantes ao déficit hídrico, a cultivar sensível BR 16 (Oya et al., 2004) e a cultivar Embrapa 48, considerada tolerante (Capítulo 1), e identificaram os genes *GmERD1-like* (*Early Responsive to Dehydration 1*), *GmRD20A-like* e *GmRD22-like* (*Responsive Desiccation*) como possíveis marcadores de expressão de déficit hídrico em soja.

Os genes diferencialmente expressos em condições de déficit hídrico podem ser classificados em genes funcionais e regulatórios. Entre os genes funcionais destacam-se aqueles codificadores para as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), as quais são classificadas em quatro grupos de acordo com a sequência de aminoácidos (Singh et al., 2009). No grupo IV são encontradas proteínas LEA18, com papel funcional no transporte de vesículas celulares (Hundertmark et al., 2011). No grupo II encontram-se as desidrinas, (Ruibal et al., 2012), proteínas que possuem papel fundamental na aclimação das plantas aos estresses abióticos, pois são importantes na proteção celular durante a desidratação e prevenção de perda da água intracelular (Hanin et al., 2011). Devido a estas funções, Park et al. (2006) estudaram em cevada desidrinas como marcadores moleculares para seleção de genótipos tolerantes à seca e identificaram correlação positiva entre desidrinas e índices de rendimento e duas desidrinas Dhn3 e Dhn4 como possíveis marcadores em estágios iniciais de plântulas.

Outra importante classe de genes funcionais candidatos a marcadores moleculares de expressão encontrados na resposta ao déficit hídrico são as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP), chaperonas moleculares que exercem diferentes papéis nos processos celulares, tais como proteção de células, translocação, acúmulo e degradação de proteínas (Park et al., 2012). As múltiplas funções desempenhadas por estas proteínas as tornam alvos interessante de estudo, uma vez que, além de participarem das respostas a estresses abióticos, como a seca ou altas temperaturas (Swindell et al., 2007), essas chaperonas atuam também nas respostas das plantas aos estresses bióticos (Wang et al. 2011).

Genes regulatórios como o gene codificador para a calmodulina (Glyma13g09550) e a desidrina ERD14 (Glyma04g01130) também podem ser considerados candidatos, pois sua expressão foi detectada em soja em resposta ao déficit hídrico (Rodrigues et al., 2012). Genes codificadores de calmodulinas e

dehidrinas também têm sido identificados nas respostas das plantas ao estresse osmótico, como consequência da exposição das plantas à seca, alta salinidade e baixas temperaturas (Apse & Blumwald 2002; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

As plantas estão sujeitas, naturalmente, à ação de múltiplos estresses. Sob condições de déficit hídrico, as plantas também podem sofrer com o aumento da temperatura ocasionada pelo fechamento dos estômatos, fato que ocorre para se manter o status hídrico da célula (Tardieu, 2013). Apesar dos múltiplos estresses serem mais danosos para os diferentes órgãos, a maioria dos estudos leva em consideração os estresses quando aplicados individualmente, assim pouco se sabe sobre a aclimação das plantas que estão sob diferentes estresses simultaneamente (Rollins et al., 2013).

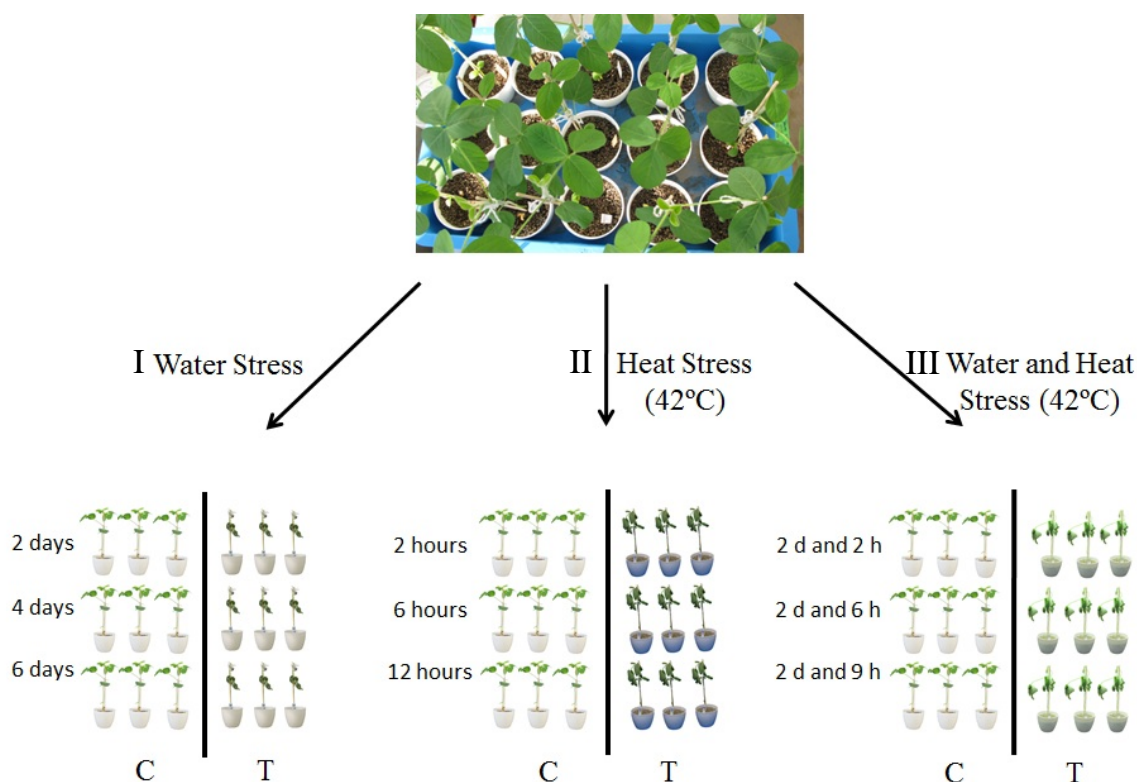
Neste contexto e visando identificar possíveis genes candidatos a marcadores moleculares de expressão, a expressão relativa dos genes codificadores das dehidrinas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130) e LEA18 (Glyma17g17860), HSPs (Glyma14g06900 e Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foi quantificada em raízes, caules e folhas das cultivares tolerante Embrapa 48 e sensível BR 16, submetidas ao déficit hídrico e à alta temperatura. Estes genes foram previamente identificados em respostas ao déficit hídrico, em estudos realizados com plantas de soja (Maruyama et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Capítulo 2).

## **7.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.3.1 Cultivo das plantas e tratamento experimental**

Sementes das cultivares BR16 e Embrapa 48, classificadas respectivamente como sensível (Oya et al., 2004) e tolerante (Kulcheski et al., 2011; Capítulo 1) à seca, foram germinadas em potes contendo 250g de solo nutriente (Maruyama et al., 2012) e cultivada sob 12h de luz ( $50 \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons/m}^2/\text{s}^{-1}$ ) a 28°C e 12 h de escuro a 25°C até o est\u00e1dio de desenvolvimento V<sub>4</sub> (Fehr et al. 1971). As plantas foram ent\u00e3o separadas em tr\u00eas grupos de 36 plantas (18 de BR16 e 18 de Embrapa 48) conforme o desenho experimental ilustrado na Figura 1. Para todos os

tratamentos experimentais (I- déficit hídrico; II- alta temperatura; III- déficit hídrico + alta temperatura), amostras de folhas, caule e raízes foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise molecular.



**Figura 1.** Esquema do delineamento experimental. As plantas cresceram em casa de vegetação com desenho experimental inteiramente casualizado contendo 3 replicatas biológicas. (I) O tratamento de Déficit Hídrico (DH) foi aplicado em casa de vegetação pela suspensão da irrigação por 2, 4 e 6 dias; (II) O tratamento de Alta Temperatura (AT) foi aplicado pela transferência das plantas para câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h luz ( $28^{\circ}\text{C}$ )/12 h escuro ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Depois de 12 h de aclimatação, as plantas controle foram mantidas a  $25^{\circ}\text{C}$  enquanto as plantas submetidas ao estresse foram submetidas a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2, 6 e 12 h; (III) No tratamento de Déficit Hídrico + Alta Temperatura (DH + AT), as plantas submetidas a 2 dias sob DH (casa de vegetação) foram transferidas para câmara de crescimento a  $42^{\circ}\text{C}$  e mantida nessa condição por 2, 6 e 9 h. C representa amostras em condições controle e T amostras tratadas.

### **7.3.2 Comportamento fisiológico das cultivares BR16 e Embrapa 48 sob déficit hídrico**

Para avaliar o efeito do déficit hídrico nas plantas de soja, um experimento com o mesmo delineamento descrito na Figura 1 (parte 1) foi realizado. Nas plantas do estágio V<sub>4</sub> a irrigação foi suspensa por 2, 3, 4 e 5 dias, quando a umidade do solo (medida por Trimer Como) foi reduzida para aproximadamente 83%. Durante o período da manhã (entre 9:00 h e 13:00 h), a taxa fotossintética (*A*) e a condutância estomática (*gs*) foram medidas nas plantas sob déficit hídrico utilizando o LiCor 6400 com fonte de luz (90% vermelha + 10% azul) e câmara de 2 cm<sup>2</sup>. As medidas foram realizadas no folíolo central do trifólio mais jovem totalmente expandida (Rodrigues et al., 2012). Pelo cálculo da razão entre *A* e *gs* foi determinado a eficiência do uso de água (EUA) intrínseco. O desenho experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições biológicas. A análise estatística foi realizada com o programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010) utilizando o teste de Tukey a 5% de significância.

### **7.3.3 Seleção de genes candidatos a serem marcadores de expressão**

Para a análise de expressão via PCR quantitativo, os genes foram selecionados a partir dos resultados observados nos trabalhos de Maruyama et al. (2012) e no Capítulo 2, nos quais Microarranjos de cDNA foram produzidos para estudar a cultivar japonesa Nourin2 e a brasileira Embrapa 48, respectivamente, sob condições de déficit hídrico.

O conjunto de genes selecionados foi avaliado em plantas submetidas tanto ao déficit hídrico quanto ao estresse por alta temperatura, uma vez que diversos genes se sobrepõem nessas respostas por serem pontos de *cross-talk* entre vias de sinalização ou por representarem genes de resposta generalizada (Atkinson & Urwin, 2012). Todos os genes selecionados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições experimentais nas quais os respectivos genes alvos foram analisados. As sequências dos genes e respectivos iniciadores utilizados nas reações de amplificação são apresentados. Glyma09g31740 (NP\_001238185) e Glyma04g01130 (NP\_001240106) codificam a proteína associada à maturação 9 (*maturation-associated protein 9\_Mat9*) e a proteína de resposta inicial a desidratação 14 (*early response to dehydration 14 protein\_ERD14*), respectivamente; Glyma14g06900 (XP\_003519372) e Glyma17g08020 (XP\_003549537) transcrevem as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins\_HSP18.2* e *HSP70*); Glyma17g17860 (NP\_001238313) transcreve a proteína de embriogênese abundante tardia 18 (*Late Embryogenesis Abundant\_LEA18*), Glyma05g33340 (NP\_001237926) que transcreve uma proteína transaldolase-like (EC EC 2.2.1.2) e Glyma13g09550 (XP\_003542013) que transcreve uma proteína de ligação ao cálcio (CaM). As análises de expressão foram realizadas utilizando como gene referência o *GmRNAr18S* (Acesso No.: X02623.1).

Gene / Proteína predita	Papel Funcional	Estresse	Tecido	Iniciador Inicial	Iniciador Final	Artigos
Glyma09g31740 / Mat9	Dehidrina	DH	Caule	5' GTAATGTAAGGGTCTTATATATG 3'	5' ACCACGTAGGCTTTACATGT 3'	Shih et al., 2012
		AT	-			
		DH + AT	Folha			
Glyma04g01130 / ERD14	Dehidrina	DH	Raiz	5' AGGAAAAGGAGAGTGGTGCTC 3'	5' GAAACCCACAAGGCTGTGCAT 3'	Yamasaki et al. (2013)
		AT	-			
		DH + AT	Folha e Caule			
Glyma17g17860 / LEA18	Proteína LEA	DH	Folha	5' ACAAGTCGCTGCCACTG 3'	5' GGAACGATCTATTCTAGGAAGTG 3'	Asakura et al. (2012)
		AT	Raiz			
		DH + AT	Folha e Raiz			
		DH	Folha e	5' AGAATGGAGTGCTAACTGTTAC	5'	

Glyma14g06900 / HSP18.2	proteína HSP	AT	Raiz		CAATTAAAGATCTAGGCAGATATTTG	Scharf et al. (2001)
		DH + AT	- Caule	3'	3'	
		DH	Folha			
Glyma17g08020 / HSP70	proteína HSP	AT	Folha	5' ACTTCAACTTTGGGTTGCTTC 3'	5' TCCATCATCTCTGAAATTCACATG 3'	Roberts & Key, (1991)
		DH + AT	Folha e Caule			
		DH				
Glyma05g33340 / Transaldolase-like	ransaldolase	AT	Folha e Caule	5' TAGTTTTTGCTTTTCTTACAGGTTG 3'	5' GATATTAAGGCAGAGCACAAG 3'	Anthony & Emerich (1990)
		DH + AT	Folha e Caule			
		DH	Folha			
Glyma13g09550 / CaM	Calmodulina	AT	Folha	5' GGACATGATGCTGCTTACTAC 3'	5' ACAATGACCACGAACAGACA 3'	Lee et al. (1995)
		DH + AT	Folha			
RNAr18S				5'GGTTGACAGACTGAGAGCTCTTTC 3'	5'CAAATCGCTCCAATAAGAAC 3'	Stolf-Moreira et al. (2011)

(DH) Déficit Hídrico; (AT) Alta Temperatura.

### 7.3.4 Extração do RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo.

O RNA total das amostras de plantas de soja submetidas ao déficit hídrico e a altas temperaturas foi extraído usando-se o reagente RNAiso (TakaRa Bio Inc<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.takara-bio.com/>). A qualidade do RNA foi analisada pelo Bioanalyzer (Agilent) e apenas as amostras com RIN $\geq$  8.0 foram utilizadas na síntese de cDNA (Qin et al. 2008). Os iniciadores para as análises de PCR dos genes alvo e o gene referência *GmrRNA18S* (X02623.1) (Stolf-Moreira et al., 2011) estão apresentados na Tabela 1. Reações individuais (conjuntos de plantas controle e plantas submetidas aos estresses) foram realizadas em triplicatas (triplicatas técnicas em cada uma das reações) para cada gene alvo, gene referência e amostras de controle negativo.

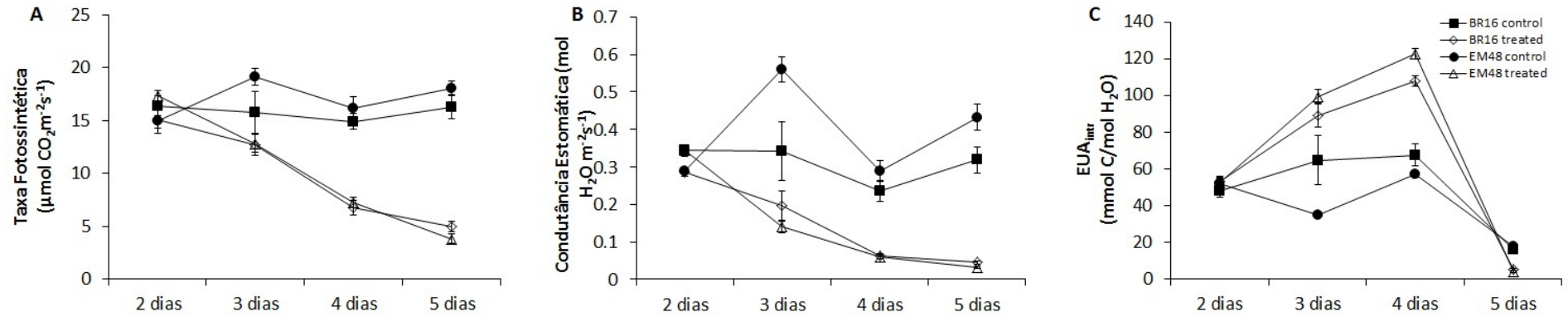
As reações de amplificação foram realizadas no termociclador 7300 *Real Time System* (Applied Biosystem) utilizando a química de reação por fluorescência Syber Takara<sup>®</sup> Fluorescence Chemical (Takara<sup>®</sup>). As reações foram compostas de um ciclo inicial de denaturação (95°C por 10 s), seguido de 40 ciclos a 95°C, por 5 s e anelamento a 60°C, por 35 s. Controles negativo (Síntese de cDNA realizada sem a enzima transcriptase reversa) e amostras em branco (água deionizada esterilizada no lugar da amostra de cDNA) foram incluídas e a etapa de dissociação (95°C for 15 s; 60° for 1 min; 95°C for 15 s; 60°C for 15 s) também foi realizada. A análise de dados foi realizada de acordo com Livak & Schmittgen (2001), na qual os valores de Ct do gene referência e plantas controle (calibrador) foram empregados como endógenos para normalizar a expressão relativa dos genes alvos.

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1 Resposta fisiológica sob déficit hídrico.

Para avaliar o efeito do déficit hídrico sob as plantas das cultivares de soja BR 16 e Embrapa 48, medidas de trocas gasosas foram realizadas após 2, 3, 4 e 5 dias de déficit hídrico. Os resultados mostraram que uma significativa diminuição de *A* e *gs*, ocorreu assim como o aumento da EUA nas plantas submetidas ao déficit hídrico, enquanto na situação controle a cultivar Embrapa 48, na maioria das vezes, teve maiores valores de trocas gasosas que a cultivar BR 16 (Figura 2).

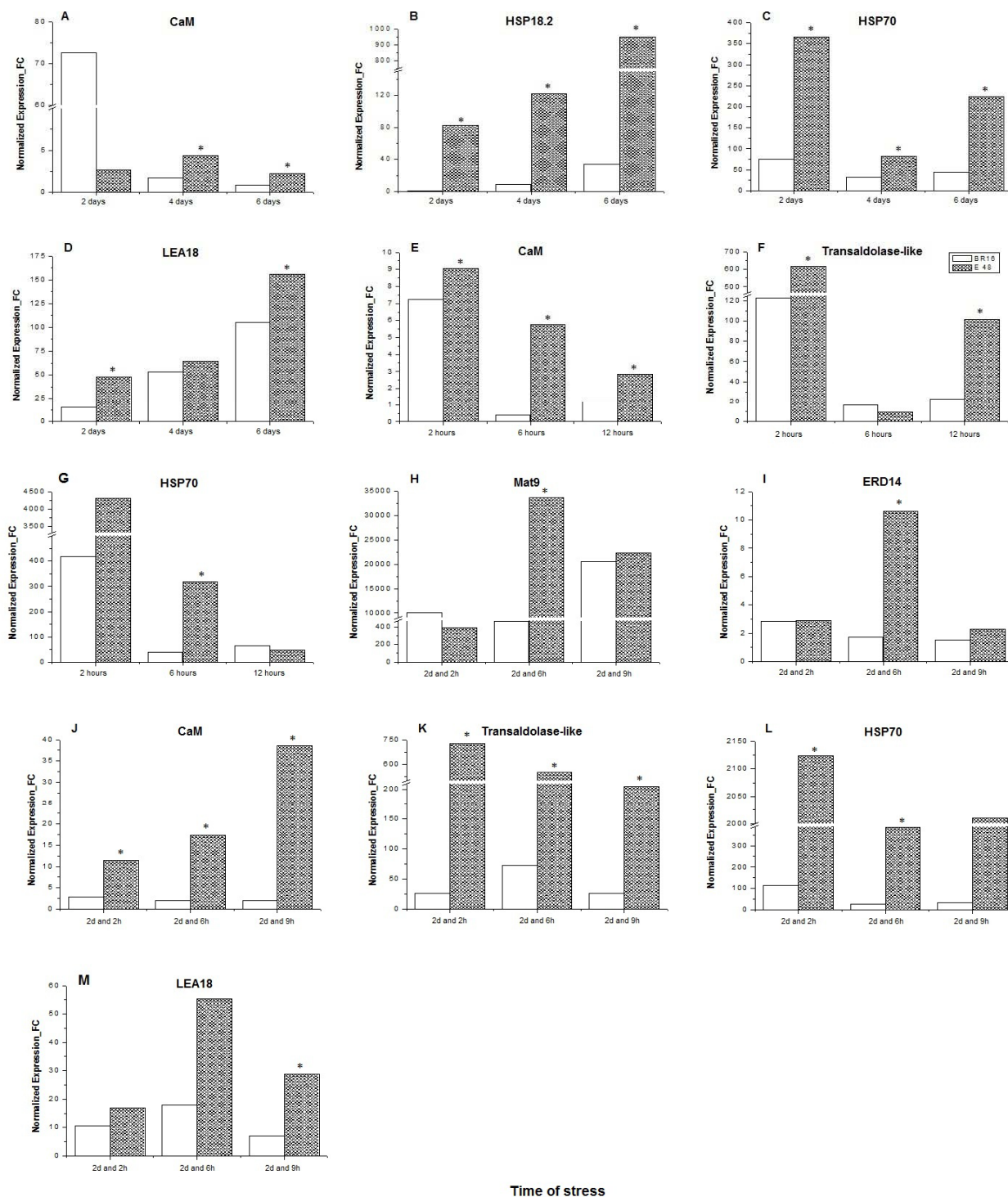
Medidas de condutância estomática (Figuras 2 B) foram utilizadas para monitorar o déficit hídrico e certificar que o tratamento imposto seria suficiente para induzir a expressão de genes de respostas (Figura 2). Os resultados mostraram que no segundo dia de tratamento as plantas de ambas as cultivares se encontravam em situação de boa disponibilidade de água ( $g_s > 0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); no terceiro dia, a condição era de déficit moderado ( $g_s = 0,1 \text{ to } 0,2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); e no quarto e quinto dias, as plantas estavam sob déficit considerado severo ( $g_s < 0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Flexas et al. 2004).



**Figura 2.** As trocas gasosas das plantas BR16 e Embrapa 48 foram analisadas sob condições bem irrigadas e sob déficit hídrico durante cinco dias consecutivos ( $p < 0,05$ ;  $n = 3 \pm$  erro padrão da média). (A) Taxa Fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); (B) Condutância Estomática ( $\text{H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e (C) Eficiência de Uso de Água Intrínseco ( $\text{EUA}_{\text{intr}}$ ,  $\text{mmol C/mol H}_2\text{O}$ ).

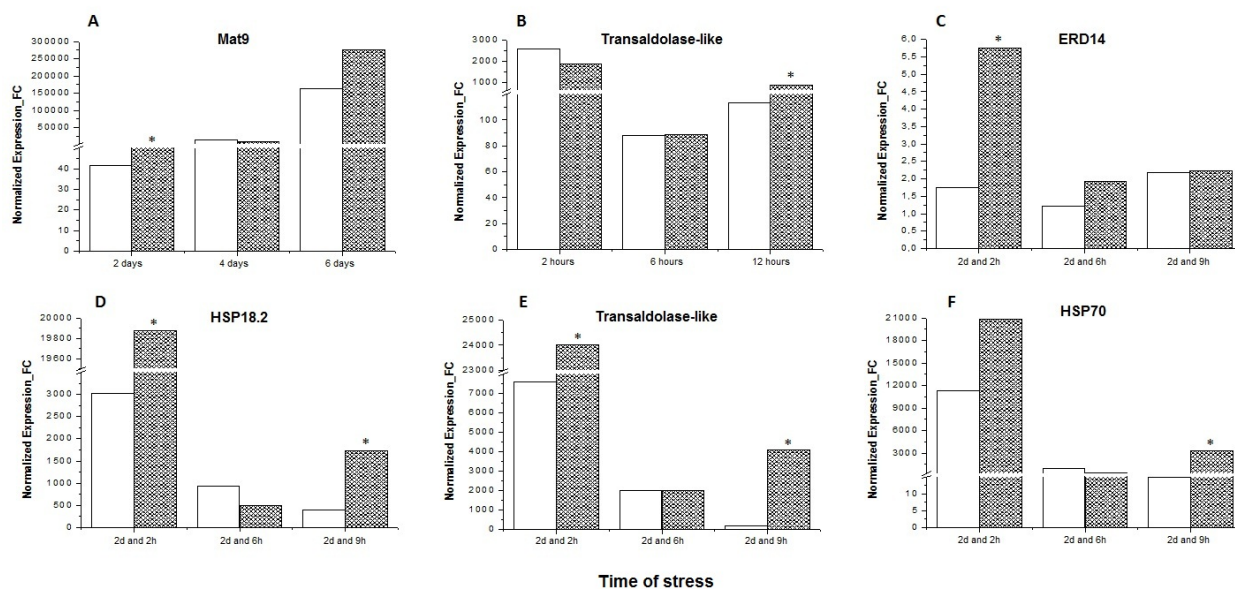
#### **7.4.2 Análise de expressão de genes induzidos sob déficit hídrico e alta temperatura e seus efeitos isolados e combinados.**

A quantificação da expressão dos genes das proteínas LEA (dehidrinas Mat9\_Glyma04g1130, ERD14\_Glyma09g31740 e proteína LEA18\_Glyma17g17860), HSPs (HSP18.2\_Glyma14g06900 e HSP70\_Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foi realizada em tecido foliar, caule e raízes, exceto para a calmodulina (Glyma13g09550) que foi avaliada apenas em folhas e para a proteína LEA18 (Glyma17g17860) que não foi avaliada no tecido caulinar. Todas essas análises foram realizadas em plantas submetidas ao déficit hídrico (2, 4 e 6 dias) e à alta temperatura (42°C por 2, 6 e 12 h) separadamente e também em plantas submetidas aos dois estresses combinados.

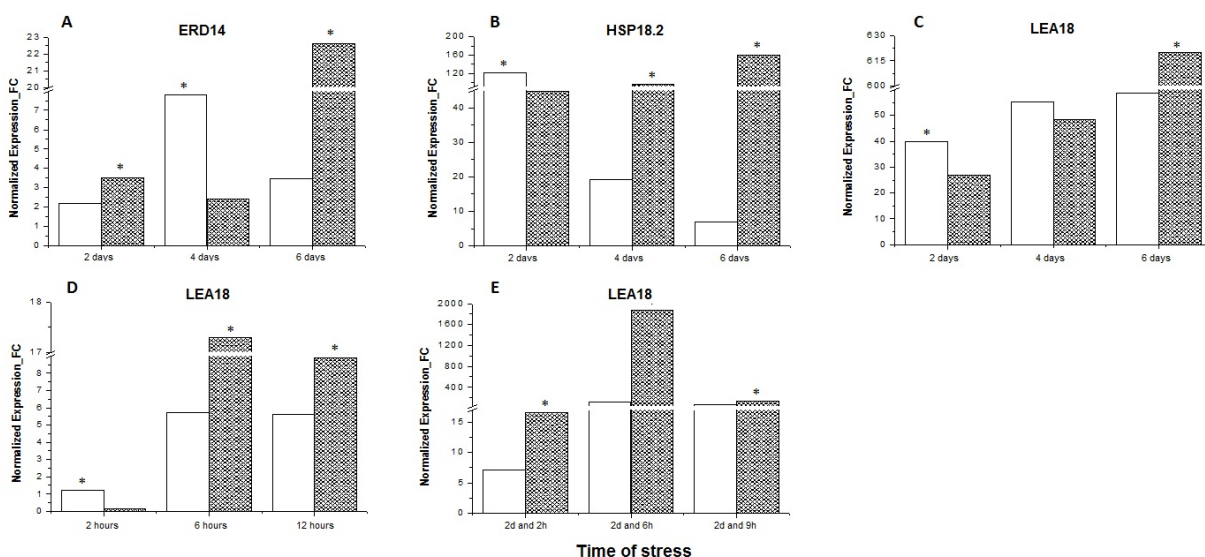


**Figura 3.** Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre as cultivares (comparação dentro do

mesmo gene e mesmo tempo). Folhas sob (A-D) déficit hídrico; (E-G) alta temperatura; (H-M) déficit hídrico e alta temperatura combinados.



**Figura 4.** Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre as cultivares (comparação dentro do mesmo gene e mesmo tempo). Caules sob (A) déficit hídrico; (B) alta temperatura; (C-F) déficit hídrico e alta temperatura combinados.



**Figura 5.** Análise de expressão gênica de plantas de soja (BR16 e Embrapa 48) sob déficit hídrico e alta temperatura em tratamentos isolados e combinados. Os genes codificadores para as proteínas Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e calmodulina (Glyma13g09550) foram avaliados por qPCR utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A expressão gênica foi normalizada pelo gene RNAr18S e a expressão relativa foi determinada em comparação com as expressões gênicas das respectivas plantas controle (calibrador). As barras brancas representam as plantas BR16 e as quadriculadas as plantas Embrapa 48. \* indica que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as cultivares (comparação dentro do mesmo gene e mesmo tempo). Raízes sob (A-C) déficit hídrico; (D) alta temperatura; (E) déficit hídrico e alta temperatura combinados.

Na cultivar Embrapa 48, os genes das desidrinas apresentaram maior expressão em dois dias de déficit hídrico em caules (*Mat9* - 1050 Fold-Change- FC-, Figura 4A) e em dois e seis dias de déficit hídrico em raízes (*ERD14* - 3,51 FC e 22,62 FC) respectivamente (Figura 5A). No déficit hídrico combinado ao estresse por alta temperatura, estes transcritos apresentaram maior expressão em folhas da cultivar tolerante no período de 2 dias de déficit hídrico e 6 h sob 42°C (*Mat9* – 33.643 FC, Figura 3H e *ERD14* - 11 FC, Figura 3I, respectivamente) do que na cultivar sensível (*Mat9*– 464 e *ERD14*- 2 FC, Figura 3I).

A expressão de outro gene de proteína LEA, a *LEA18* (Glyma17g17860), também apresentou diferenças de expressão em dois e seis dias de déficit hídrico em folhas, entre a cultivar tolerante (48 FC e 156 FC, respectivamente) e as plantas sensíveis à seca (15 FC e 105 FC, respectivamente, Figura 3D). No estresse por alta temperatura a diferença significativa foi observada no tecido radicular da cultivar tolerante, a qual apresentou maior expressão no tratamento intermediário (17 FC – 6 h) seguido do tratamento final do estresse por alta temperatura (9 FC, em 12 h). Apesar de não significativa, a expressão do gene *LEA18* também foi ligeiramente superior em folhas sob alta temperatura, principalmente no início do estresse como observado pelo valor de 5,82 FC em duas horas de estresse na cultivar tolerante, em comparação com os valores de 3,83 na cultivar sensível. Já no estresse combinado (déficit hídrico + alta temperatura) os valores de expressão foram superiores no tecido foliar da planta tolerante em todos os períodos avaliados (Figura 3M), apesar de a expressão gênica ter sido significativa apenas no período final do estresse (29 FC na planta tolerante Embrapa 48 e 7 FC na sensível BR 16) (Figura 3M). Esse gene também foi diferencialmente expresso em raízes nesse mesmo estresse

(déficit hídrico e alta temperatura combinados) nas plantas tolerantes, em todos os períodos avaliados, apresentado a máxima expressão no estresse intermediário de dois dias de déficit hídrico somado a seis horas de estresse por alta temperatura (42°) (1876 FC na Embrapa 48 e 117 FC na BR 16) (Figura 5E).

Ainda na classe dos genes funcionais, os genes das HSPs (*HSP18.2\_Glyma14g06900* e *HSP70\_Glyma17g08020*) também apresentaram maior expressão no tecido foliar da cultivar tolerante nos três períodos de desidratação (Figura 3B, 3C). Para o gene *HSP18.2*, a expressão aumentou gradativamente até alcançar o pico máximo de expressão no período mais prolongado do déficit hídrico (6 dias) (82 FC, 122 FC e 952 FC, respectivamente aos 2, 4 e 6 dias de tratamento, Figura 3B). Já para o gene *HSP70* a maior expressão foi encontrada no início da desidratação (02 dias) (366 FC, Figura 3C), seguida do período final do tratamento (06 dias) (223 FC, Figura 3C) em folhas da cultivar Embrapa 48 quando comparada aos valores de expressão observados na cultivar BR 16 (75 FC e 45 FC, Figura 3C respectivamente). Por outro lado, no tecido caulinar das plantas sob déficit hídrico não foram identificadas diferenças significativas de expressão gênica entre as cultivares, contudo, no tecido radicular a expressão do *HSP18.2* foi maior em quatro (97 FC) e seis dias sob déficit hídrico (160 FC, Figura 5B) na cultivar tolerante. Perfil semelhante de aumento da expressão na intensificação do déficit hídrico foi detectado no tecido foliar e radicular das plantas Embrapa 48 (Figura 3B e 5B).

No estresse por alta temperatura os genes de HSPs (*Glyma17g0820* e *Glyma14g06900*) demonstraram perfil de expressão semelhante no tecido foliar, como observado pela maior expressão, na cultivar tolerante, do *HSP70* em seis horas de estresse por alta temperatura (319,23 FC, Figura 3G) e maior expressão, apesar de não significativa, do gene *HSP18.2* no início do tratamento (2 h), a partir do qual a expressão foi decrescendo no decorrer dos períodos.

Quando os dois tratamentos foram combinados (DH + AT), o gene *HSP70* (*Glyma17g08020*) mostrou maior expressão em folhas da cultivar tolerante em todos os períodos dos tratamentos, mas apresentou significância no tempo inicial e intermediário do tratamento e ponto máximo de expressão no início do estresse (2 dias de déficit hídrico + 2 horas de estresse por alta temperatura – 2124 FC, Figura 3L). Esse gene HSP também foi altamente expresso no tecido caulinar da cultivar tolerante (3281 FC), comparado à cultivar sensível (15 FC), no período mais severo

do déficit hídrico (6 dias) combinado ao estresse por alta temperatura (42°C) (Figura 4F). Nesse mesmo estresse combinado, o *HSP18.2* (Glyma14g06900) apresentou expressão diferencial no período inicial (2 dias de déficit e 02 h a 42°C) (19,870 FC, Figura 4D) e mais severo (6 dias de déficit e 12 h a 42°C) em caules (1,734 FC) da cultivar Embrapa 48, quando comparada com a cultivar sensível BR 16 (388 e 3,020 FC, Figura 4D).

Para o Glyma05g33340 que transcreve uma transaldolase-like, os resultados de quantificação gênica indicaram, apesar de não apresentar significância, uma tendência de expressão em todos os tratamentos de déficit hídrico no tecido foliar das plantas Embrapa 48, como observado pelos valores de expressão nos três períodos de estresse (2 dias - 320 FC, 4 dias - 7,144 FC e 6 dias - 188 FC) quando comparados à expressão da cultivar BR 16 (2 dias - 140 FC, 4 dias - 156 FC e 6 dias - 94 FC). Também no tratamento de alta temperatura, foi observada uma maior expressão desse gene em folhas da cultivar Embrapa 48 no período inicial (02 h a 42°C – 616 FC, Figure 3F) e final do tratamento (12 h a 42°C – 101 FC, Figura 3F).

No tecido caulinar da planta tolerante sob estresse por alta temperatura, o padrão de expressão observado apresentou valores superiores aos observados na cultivar sensível em 12 horas de estresse (844 FC, Figura 4B). No estresse combinado, a expressão do gene da transaldolase (Glyma05g33340) em folhas foi maior em todos os períodos na cultivar Embrapa 48, com o pico de expressão no período inicial (2 dias de déficit hídrico e 2 horas de estresse por alta temperatura – 728 FC, Figura 3K). Em caules, da cultivar tolerante, a maior expressão do gene da transaldolase também foi observada no início do estresse seguido do período final (24016 FC e 4089 FC, Figura 4E, respectivamente).

O gene que transcreve a calmodulina (Glyma13g09550), classificado na categoria de genes regulatórios, apresentou diferença significativa de expressão gênica entre os períodos finais (04 e 06 dias) do tratamento de déficit hídrico no tecido foliar entre as cultivares, sendo que o nível de expressão foi maior na Embrapa 48 (4,33 FC e 2,22 FC, Figure 3A) do que na cultivar BR 16. De forma semelhante ao que foi observado no déficit hídrico, no estresse por alta temperatura houve maior expressão em folhas da cultivar tolerante, mas, nesse caso, a expressão foi superior em todos os períodos porém com diminuição no decorrer dos tratamentos (9, 6 e 3 FC em 2, 9 e 12 h a 42°C, Figura 3E, respectivamente).

Considerando o efeito do estresse combinado de déficit hídrico + alta

temperatura, o perfil de expressão do Glyma13g09550 em folhas, na cultivar tolerante à seca, foi oposto àquele observado nas plantas submetidas apenas ao estresse por alta temperatura (Figura 3A e 3J). Em condições de estresse combinado, a expressão deste gene aumentou no decorrer dos períodos, apresentando o pico no final do estresse (06 dias de déficit hídrico e 12 h a 42°C) (11 FC, 17 FC e 39 FC nas plantas da cultivar Embrapa 48, Figura 3J; e 3 FC, 2 FC e 2 FC nas plantas da cultivar BR 16, Figura 3J).

#### 7.4.3 Identificação de marcadores moleculares de expressão

Os genes candidatos a marcadores de expressão de déficit hídrico em folhas foram *HSP18.2*, *HSP70*, ambos significativamente expressos durante todo o déficit hídrico (Figura 3B, 3C), *LEA18*, induzido no início e fim do déficit hídrico (2 e 6 dias) (Figura 3D) e o gene *CaM*, observado nos períodos intermediário e final do tratamento (4 e 6 dias) (Figura 3A). Em caules o marcador de déficit hídrico foi o gene da desidrina *Mat9* (Figura 4A), expressa desde o início do déficit hídrico. Em raízes, o *ERD14* (Glyma04g01130) expresso nos períodos inicial e final do déficit hídrico (Figura 5A), o gene da *HSP18.2* detectados nos períodos intermediário e final (Figura 5B) e o gene *LEA18* no final do déficit hídrico (Figura 3C) foram considerados os melhores candidatos para este tecido e condição experimental.

No estresse por alta temperatura os possíveis marcadores de expressão em folhas foram o gene da *HSP70* no período intermediário de 6 h a 42°C (Figura 3G), o gene da transaldolase-like observado no início e final do tratamento (2 e 6 h a 42°C) (Figura 3F) e o *CaM*, também expresso durante todo o tratamento experimental (Figura 3E). Em caules foi considerado como marcador de expressão o gene *transaldolase-like*, no final do estresse, em 12 h de estresse por alta temperatura (12 h a 42°C) (Figura 4B) e em raízes o gene da proteína *LEA18*, induzido no período intermediário e final do estresse (6 e 12 h a 42°C) (Figura 5D).

No déficit hídrico + alta temperatura foram encontrados as maiores diferenças entre as cultivares sensível e tolerante, resultados interessantes já que comumente o déficit hídrico e o estresse térmico afetam as plantas de forma concomitante. Assim, os marcadores de expressão identificados no presente estudo que responderam ao estresse combinado em folha foram os genes das desidrinas, principalmente no período intermediário (2 dias de déficit hídrico + 6 h a 42°C) (Figura 3H, 3I), o da proteína *LEA18* no período final (2 dias de déficit hídrico + 9 h a

42°C) (Figura 3M), da *HSP70* nos períodos inicial e intermediário (2 dias de déficit hídrico + 2 h a 42°C e 2 dias de déficit hídrico + 6 h a 42°C) (Figura 3L), e da transaldolase-like e calmodulina em todos os períodos do tratamento (Figuras 3K, 3J, respectivamente). Em caules os marcadores considerados foram os genes das *HSPs* e o da transaldolase-like no início e final do tratamento tratamentos (2 dias de déficit hídrico + 2 h a 42°C e 2 dias de déficit hídrico + 9 h a 42°C) (Figura 4D, 3F, 3E, respectivamente). Em raízes, a expressão do gene codificante para a proteína *LEA18* observada em todos os períodos foi considerada para a seleção deste gene como candidato a marcador.

De forma geral, os níveis de expressão significativamente maiores na cultivar tolerante Embrapa 48 foram levadas em consideração na seleção dos candidatos a marcadores moleculares de expressão e os resultados mais promissores para cada tecido e tratamento estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Marcadores de expressão para déficit hídrico. Os genes foram selecionados a partir dos resultados mais significativos observados em cada condição experimental avaliada. Mat9 (Glyma09g31740), ERD14 (Glyma04g01130), LEA18 (Glyma17g17860), HSP20 (Glyma14g06900), HSP70 (Glyma17g08020), transaldolase-like (Glyma05g33340) e Calmodulina (Glyma13g09550).

<b>Tecido</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Período</b>	<b>Gene</b>
<b>Folha</b>	Seca	2, 4 e 6 dias	HSP18.2
		2, 4 e 6 dias	HSP70
		4 e 6 dias	CaM
	Alta temperatura	6 horas	HSP70
		2 e 12 horas	Transaldolase
	Seca + Alta Temperatura	2d + 6h	Mat9
2d +2h e 2d + 6h		HSP70	
<b>Caule</b>	Seca	2dias	Mat9
	Alta Temperatura	12 horas	Transaldolase

	Seca + Alta Temperatura	2d +2h e 2d + 9h	Transaldolase
	Seca	6 dias	LEA18
<b>Raiz</b>	Alta Temperatura	6 e 12 horas	LEA18
	Seca + Alta Temperatura	2d +2h e 2d + 9h	LEA18

## 7.5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou a transcrição dos genes da classe funcional, como genes de proteínas LEA (dehidrinas e a *LEA18*) e a transaldolase, e o gene da classe regulatória, a calmodulina, nas cultivares de soja sensível (BR 16) e tolerante à seca (Embrapa 48) em condições de déficit hídrico e estresse por alta temperatura, realizados de forma isolada e combinada. A aplicação do tratamento experimental combinado (déficit hídrico + alta temperatura) foi realizada visando simular as condições reais que ocorrem em condições de campo e em casa de vegetação, no qual as plantas estão expostas simultaneamente aos dois estresses.

A expressão dos genes de dehidrinas (DHNs) (*Glyma09g31740* e *Glyma04g01130*) nos tecidos de folhas, caules e raízes durante o déficit hídrico e estresse por alta temperatura foi significativa nas plantas Embrapa 48 em relação às BR16. As dehidrinas ou proteínas do grupo 2 LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) desempenham um papel fundamental na resposta da planta e adaptação a estresses abióticos. Elas se acumulam tipicamente em sementes em maturação ou são induzidas em tecidos vegetativos em condições de salinidade, desidratação, estresse ao frio e congelamento (Hanin et al., 2011; Ruibal et al., 2012). Seus diferentes perfis espaciais refletem os genes LEA presentes no genoma e isso juntamente com o grande número de genes encontrado no genoma representam boas estratégias que as plantas têm para sobreviver a diferentes estresses abióticos (Shih et al., 2010). A expressão de muitas DHNs é aumentada em presença do fitohormônio ácido abscísico (ABA), e por isso são também referidas como proteínas

RAB (*Responsive to ABA*). Alguns estudos utilizando as desidrinases como marcadores de expressão de tolerância a estresse abióticos já foram reportados (Prášil et al., 2007). Ismail et al. (1999) estudaram a tolerância ao resfriamento durante a emergência de plântulas da leguminosa tropical *Vigna unguiculata*. Estes pesquisadores apontaram uma correlação positiva no acúmulo da desidrina DHN1 (tipo Y2K de 35 kDa) em sementes de uma linhagem resfriamento-tolerante.

Diferenças quantitativas na expressão gênica de desidrina e no acúmulo da proteína em condições de baixas temperaturas (frio e geada) têm sido amplamente estudadas em Triticeae, cultivada em clima temperado. Em trigo (*Triticum aestivum*), Houde et al. (1992) descreveram uma correlação positiva entre o acúmulo de uma desidrina da família WCS120 e o nível de tolerância à geada adquirida pela planta. Além disso, Vítámvás et al. (2010) foram capazes de distinguir a nível de proteínas WCS120 20 cultivares de trigo com diferentes níveis de tolerância à geada, crescendo a 17°C ou a 9°C. Parece possível, então, o uso do nível das proteínas WCS120 em plantas de trigo cultivadas a baixas temperaturas (17 - 9°C) para se estimar a sobrevivência das plantas no inverno, aprimorando os procedimentos de pré – seleção em programas de melhoramento de trigo, visando tolerância à geada.

Em estudos de déficit hídrico, Pelah et al. (1997) identificaram uma correlação positiva entre a tolerância a seca e o acúmulo de proteínas desidrinases em *Populus popularis*. Além disso, Park et al. (2006) encontraram uma correlação positiva entre o acúmulo de transcritos das desidrinases Dhn3 e Dhn4 e parâmetros associados à tolerância ao déficit hídrico (conteúdo relativo de água e índice de rendimento sob seca) em cultivares coreanos de cevada. De modo similar, Labhili et al. (1995) relataram uma correlação positiva entre o nível de transcritos de desidrinases e a tolerância ao déficit hídrico em duas diferentes cultivares tolerantes de trigo duro (*T. Turgidum ssp. durum*).

O Glyma04g01130, também uma proteína LEA, foi identificado e denominado *GmERD14* no trabalho de Yamasaki et al. (2013) por ser altamente similar ao gene *ERD14* de *Arabidopsis*. A expressão diferenciada do *GmERD14* na cultivar tolerante, Embrapa 48, em condições consideradas de estresse leve foi detectada em caules no período inicial do déficit hídrico + alta temperatura (5,76 FC) e em raízes das plantas tolerantes submetidas ao déficit hídrico após 2d (3,51 FC, Figura 5A). Esses dados são corroborados pelos trabalhos de Nylander et al. (2001) e Welin et al. (1994) que detectaram a expressão do *ERD14* em alguns tecidos em divisão ativa,

como extremidades de raízes e folhas em plantas sob condições normais.

Ademais, a expressão do gene *ERD14* especialmente no tecido radicular após 6 dias de exposição ao déficit hídrico (22 FC Figura 5A) ou em condições iniciais de estresse combinado (2 dias de déficit e 2 h a 42°C) (3 FC), foi considerada superior na cultivar tolerante quando comparado à cultivar sensível. Esses dados foram corroborados por Kovacs et al. (2008) que em seu estudo sugeriram que a proteína ERD14 é um tipo de IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins*), estável em calor e sensível a proteases. Isso acontece porque a ERD14 se liga a vesículas de fosfolípidios conferindo aumento da tolerância à desidratação e age contra agregação térmica da citrato sintase (EC 2.3.3.1), firefly luciferase (EC 1.13.12.7), na inativação do álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) e da lisozima (EC 3.2.1.17) (Kovacs et al., 2008). Assim, durante o estresse térmico, a indução por ABA de genes funcionalmente semelhantes à chaperonas moleculares pode ajudar a combater desnaturação de proteínas em eventos de estresse (Divi et al., 2010). Além disso, outros estudos demonstraram que por meio da ativação da cascata de ABA houve o aumento da expressão desse gene em condições de seca e alta salinidade (Kiyosue et al., 1994; Nylander et al., 2001; Welin et al., 1994; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 1996; Rorat 2006; Kim & Nam 2010).

O gene *Mat9* (*Maturation-associated protein 9*, Glyma09g31740) apresentou maior expressão no tecido foliar da cultivar Embrapa 48 sob estresse combinado (33643 FC, Figura 3H) e no tecido caulinar sob déficit hídrico (1050 FC, Figura 4A). Essa proteína, segundo Yang et al (2011), pode funcionar como estabilizadora de membrana por possuir um efeito protetor de fosfolípidios e também por impedir que depois da dessecação ocorra vazamento de lipossomos.

Ainda considerando as proteínas LEA, os resultados obtidos no presente estudo para a expressão do gene *LEA18* (Figura 3D, M, Figura C, D e E) na cultivar tolerante indicam que esse gene pode estar atuando na sinalização celular da perda de água, isso porque em *A. thaliana* a proteína *LEA18*, grupo IV dentro das proteínas LEA, é classificada como uma IDP que se liga a membranas carregadas negativamente e desempenha um papel no transporte de vesículas celulares (Hundertmark et al., 2011). Essa ligação modifica a estrutura da proteína formando uma vesícula de agregação que resulta no vazamento do conteúdo solúvel dos lipossomos. Este processo ocorre devido à formação de um domínio lipídico (ligação entre a proteína *LEA18* e os lipídios da membrana) que pode aumentar a atividade

dos canais de cálcio e de outros canais e transportadores de membrana (Hundertmark et al., 2011).

Manfre et al. (2006) relataram que mutações no gene *LEA EM6* em *A. thaliana*, resultaram em desenvolvimento aberrante da semente indicando uma possível adaptação à perda de água. O gene homólogo ao *LEA EM6* de *A. thaliana*, *LEA18* em soja, que transcreve a proteína PM35 (*Physiologically Mature*), foi estudado por Asakura et al. (2012) em vários estádios do desenvolvimento da semente e não observaram mudanças na expressão gênica. Na continuidade dos estudos de proteínas LEA, homólogas ao *LEA18*, Yang et al. (2011) analisaram em *A. thaliana* duas proteínas *GmPM6* e *GmPM16*. Os mesmos autores observaram que *GmPM6* pode atuar como estabilizador de membrana por prevenir o vazamento do lipossomo após seca (*drying*). Além disso, Shih et al. (2010) também observaram transcritos de *GmPM* em tecidos vasculares do cotilédone e eixo embrionário (epicótilo e radícula) e relataram que o gene *GmPM5* foi altamente expresso em tecidos do mesófilo sugerindo que os genes LEA podem ser altamente regulados no sistema condutor em função de mudanças no teor de água.

A análise do perfil da expressão dos genes de choque térmico, Glyma14g06900 e Glyma17g08020, indicaram no presente estudo uma diferença entre a cultivar tolerante Embrapa 48 e a sensível BR 16 (Figura 3B, C, G, L, Figura 4D, 4F, Figura 5B). Como esperado, por ser uma proteína de choque térmico (HSPs - *Heat Shock Proteins*), o Glyma17g08020 (proteína HSP70) foi induzido com maior intensidade no estresse por alta temperatura no período inicial do tratamento (2 horas) em ambas as cultivares de soja (Figura 3G, 3C). Sob déficit hídrico, a expressão do gene HSP70, foi alta no tecido foliar sob déficit hídrico (2 dias) na cultivar tolerante (366 FC, Figura 3C), e também em folhas de Embrapa 48 e BR 16 sob altas temperaturas, principalmente no início do tratamento (2 h a 42°C) (4,317 2h FC, 419 FC, Figura 3G). Quando a expressão relativa do gene HSP70 em plantas de Embrapa 48 submetidas ao déficit hídrico e ao estresse por alta temperatura combinados foi considerada, os valor de expressão relativa aumentou (Figura 3L). Considerando-se o tecido caulinar de plantas submetidas aos tratamentos combinados, os resultados do presente estudo indicam que o padrão de expressão do HSP70 foi semelhantemente alto no período inicial do tratamento (Figura 4F), assim como a expresso do gene HSP18.2 (Figura 4D).

Ainda, considerando o efeito isolado dos estresses aplicados, os genes HSPs

foram mais expressos no tecido foliar (Figura 3B, 3C, 3G, 3L) do que em raízes (Figura 5B), tanto sob condições de déficit hídrico quanto sob alta temperatura. Entretanto, quando as plantas foram submetidas ao estresse combinado, a expressão relativa foi consideravelmente mais alta no tecido caulinar (Figura 4D, 4F). Dados semelhantes de maior expressão em condições de alta temperatura foram observados por Swindell et al. (2007), que revelaram maiores níveis de expressão de HSPs entre 0,5 a 3 h de estresse por alta temperatura e maior indução por calor em relação a outros estresses abióticos como frio, estresse osmótico, salinidade e seca. Os mesmos autores relataram que as HSPs atuam na tolerância às altas temperaturas prevenindo a formação de conformações deletérias de proteínas e que os genes das HSPs das famílias 20 e 70 apresentam alto nível de expressão em tratamentos de altas temperaturas em relação a outros estresses abióticos, com valores de expressão variando entre as famílias de HSPs.

Swindell et al. (2007) estudaram ainda estas proteínas em *A. thaliana* e descobriram que os genes *HSP20* e *HSP70* quando sob condições de estresses abióticos, tais como a seca, interagem com as membranas celulares permitindo a manutenção de sua fluidez. Os resultados do presente trabalho corroboram os estudos de Swindell et al. (2007), que relataram a sobreposição de rotas moleculares ativadas em resposta aos estresses de seca e por alta temperatura e sugeriram que essas proteínas poderiam diminuir os danos resultantes do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*). Os mesmos autores também detectaram a expressão de membros da família HSP70 na parte aérea de plantas sob estresse por luz ultravioleta B e de membros das famílias HSP70, HSP90 e HSP100 nas raízes e caules em *A. thaliana* sob calor. É sabido que as HSPs desempenham diversos papéis em plantas sob condições normais auxiliando o dobramento e translocação de proteínas nascentes. Sob condições ambientais adversas, as HSPs atuam na desmontagem de agregados proteicos e no redobramento de proteínas desnaturadas (Park et al., 2012), resultado da perturbação da homeostase celular durante a desidratação, atuando no processo de aclimação destas plantas ao déficit hídrico.

O gene da classe funcional estudado foi a transaldolase-like, o qual apresentou em todos os tratamentos maior expressão no tecido foliar da cultivar tolerante em comparação à sensível (Figura 3F e 3K). Um perfil semelhante também foi observado em caules (Figura 4B e 4E). O transcrito que codifica a transaldolase-like

(Glyma05g33340) apresentou valores expressivos no tecido foliar quando as plantas foram submetidas ao tratamento isolado de alta temperatura (Figura 3F), assim como no estresse combinado (Figura 3K). No entanto, a expressão deste transcrito em tecidos de caule sob estresse combinado foi predominantemente superior (Figura 4E).

A expressão diferenciada desse gene, que fornece o link entre as rotas glicolíticas e das pentoses fosfato (Chou et al., 2011) foi relatada em trabalhos com folhas de plântulas de arroz sob déficit hídrico (Reddy et al., 2002) e sob estresse salino entre cultivares com capacidade de tolerância contrastantes (Daldoul et al. 2010). Esse é um fato muito importante porque a transaldolase em algumas plantas, fungos e microrganismos catalisa uma reação reversiva da via oxidativa das pentose fosfato (OPP), onde um dos produtos é o eritrose-4-fosfato (erythrose-4-phosphate), que se condensa com fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate \_ PEP) para formar corismato. Esse corismato é o precursor de muitas rotas de metabólitos secundários, como protetores de luz UV, acetato de índole (indole acetate), lignina, flavonóides e aminoácidos aromáticos (Nulit, 2012). Particularmente, a luz UV intensa diminui a fotossíntese durante o déficit hídrico e a alta temperatura por afetar o aparato fotossintético, como observado por Munné-Bosch & Alegre (2000), os quais mostraram que plantas expostas à luz elevada e à seca diminuíram a eficiência fotoquímica do fotossistema PS 2 em aproximadamente 65%. A expressão diferencial da transaldolase-like em cultivares tolerantes à seca pode ser um indicador da sobrevivência por maiores tempos em condições adversas.

No presente estudo, o Glyma13g09550 (o qual codifica para a calmodulina) foi diferencialmente expresso em todos os tratamentos avaliados no tecido foliar (Figura 3A, 3E, 3J). Contudo, níveis de expressão relativamente baixos foram observados para os estresses isolados, exceto para as plantas da cultivar sensível após 2 dias sob déficit hídrico (Figura 3A). No entanto, quando as plantas foram submetidas ao estresse combinado, a expressão deste gene aumentou progressivamente ao longo dos períodos (Figura 3J). Este resultado está dentro do esperado já que estímulos abióticos como a seca ativam respostas aclimatativas e transmitem informações por meio das mudanças do  $Ca^{2+}$  intracelular causadas por estímulos externos (Xu et al., 2011). Esses sinais de  $Ca^{2+}$  são percebidos pela calmodulina (CaM), um dos melhores sensores caracterizados em eucariotos, e outros diferentes sensores de  $Ca^{2+}$ .

Tais dados são corroborados também pelos trabalhos de Liu et al. (2008) e Zhang et al. (2009), que destacaram o papel de CaM e a sinalização mediada por cálcio na adaptação e tolerância ao estresse por alta temperatura. Isso porque a rota de sinalização  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM tem um importante papel na transdução de sinal no estresse térmico em *Arabidopsis*. Esse fato ocorre porque o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a CaM, que estimula o CBK2, que por sua vez regula a fosforilação das proteínas HSFs (*Heat Shock Factor*) que se liga as HSE (*Heat Shock Elements*) iniciando assim, a transcrição de genes HSP (aclimação das plantas ao estresse ambiental de calor). Como prova, foi observado que o silenciamento de CaM diminuiu a termotolerância em *A. thaliana* (Zhang et al., 2009). Porém, mais estudos devem ser realizados para comprovar se a CaM está envolvida na resistência ao estresse oxidativo gerado pelo estresse por alta temperatura. Resultado semelhante foi encontrado por Ding et al. (2012) em folhas de tomate, quando estudaram as vias de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, e observaram que a regulamentação de mecanismos antioxidantes induziu a resistência ao estresse oxidativo gerado pelo estresse por calor. Esses autores concluíram que as vias de sinalização  $\text{Ca}^{2+}$ -CAM estão envolvidas na resistência aos estresses oxidativo e à alta temperatura por ativarem enzimas de defesa antioxidante que atuam na eliminação de ROS produzidas pelo estresse por calor, diminuindo o dano oxidativo gerado na célula.

Xu et al. (2011) também observaram em seu estudo, superexpressando o gene *OsMSR2* (gene calmodulina-like em arroz), o aumento da tolerância de plantas de *A. thaliana* à seca, o qual foi acompanhado pela alteração na expressão de genes responsivos ao ABA e pôde ser observado devido a duas estratégias de proteção contra o déficit hídrico e salino. Uma dessas estratégias é a diminuição da taxa transpiratória e/ou redução da densidade estomática. A redução da densidade estomática é conhecida por afetar as trocas de água e  $\text{CO}_2$  (Hetherington & Woodward 2003).

Trabalhos realizados no Capítulo 1 demonstraram que as plantas da cultivar Embrapa 48 apresentaram menor transpiração que plantas da cultivar BR 16 em condições bem irrigadas além de possuírem maior condutância estomática nessas condições, resultados também encontradas no presente estudo (Figura 2B). Além disso, dados de expressão gênica observados neste estudo (Figura 3A) demonstraram maiores valores de expressão gênica das CaM na cultivar tolerante durante o período severo do déficit hídrico. A outra estratégia de proteção contra o

déficit hídrico e salino observada por Xu et al. (2011) pode vir a partir das propriedades regulatórias do gene *OsMSR2* que induziu a expressão de *RD29A* e *P5CS1*, e, possivelmente, indução de outros genes nas plantas transgênicas. Assim, os resultados observados no presente estudo sugerem que o trabalho coordenado das proteínas codificadas pelos genes descritos acima possam ser um dos responsáveis do aumento da tolerância das plantas transgênicas à seca e à salinidade.

As diferenças encontradas entre as cultivares para o padrão de expressão das desidrinas, *LEA18*, transaldolase-like, HSPs e CaM devem ser um dos responsáveis pelo maior nível de tolerância à seca da cultivar Embrapa 48 quando comparada à cultivar BR16 isso juntamente com a expressão de outros genes cujos produtos aumentem ou intermedeiem o aumento do ajuste osmótico ou demais características responsáveis pela maior tolerância ou maior uso conservativo de água dessa cultivar, como observado no Capítulo 1.

Rodrigues et al. (2012) analisaram as mesmas cultivares estudadas do presente estudo e observaram diferenças entre plantas sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico quanto à presença de desidrinas e HSPs. Os autores classificaram as desidrinas e HSPs na classe dos genes funcionais de resposta à seca e encontraram expressão da desidrina *ERD14* em folhas e raízes nas duas cultivares com a diferença que em raízes a presença do transcrito foi detectada nos tratamentos intermediário e final na cultivar Embrapa 48 enquanto na BR16 foi encontrada apenas no estresse final. Foi detectada a expressão do gene da desidrina *Mat9* na cultivar tolerante no tecido foliar, enquanto nas na cultivar sensível apenas em raízes (Rodrigues et al., 2012).

## 7.6 CONCLUSÕES

No déficit hídrico os marcadores de expressão identificados em folha foram os genes *HSP18.2* (Glyma14g06900), *HSP70* (Glyma17g08020) e a calmodulina (Glyma13g09550), em caules *Mat9* (Glyma09g31740), e em raízes o *LEA18* (Glyma17g17860).

No estresse por alta temperatura os possíveis marcadores de expressão em folhas foram os genes *HSP70* e transaldolase-like, em caules a transaldolase e em raízes a *LEA18*.

No déficit hídrico e estresse por alta temperatura combinados os marcadores de expressão foram *Mat9* e *HSP70* em folhas, a transaldolase-like em caules e *LEA18* em raízes.

Os resultados indicam que os referentes genes são úteis na identificação de tolerância em cultivares de soja.

## 7.7 REFERÊNCIAS

- Al-Doss AA, Elshafei AA, Moustafa KA, Saleh M, Barakat MN (2011) Comparative analysis of diversity based on morpho-agronomic traits and molecular markers in durum wheat under heat stress. *African Journal of Biotechnology*. 10: 3671-3681.
- Anthon GE & Emerich DW (1990) Developmental regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiology*. 92: 346-351.
- Apse MP & Blumwald E (2002) Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 146-150.
- Asakura T, Tamura T, Terauchi K, Narikawa T, Yagasaki K, Ishimaru Y, Abe K (2012) Global gene expression profiles in developing soybean seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 52: 147-153.
- Atkinson NJ & Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. 63: 3523-3543.
- Badicean D, Scholten S & Jacota A (2011) Transcriptional profiling of *Zea mays* genotypes with different drought tolerances – new perspectives for gene expression markers selection. *Maydica*. 56: 1724.
- Chou H, Tam MF, Chiang CH, Chou CT, Tai HY, Shen HD (2011) Transaldolases are novel and immunoglobulin E cross-reacting fungal allergens. *Clinical & Experimental Allergy*. 41: 739-749.
- Daldoul S, Guillaumie S, Reustle GM, Krczal G, Ghorbel A, Delrot S, Mliki A, Höfer MU (2010) Isolation and expression analysis of salt induced genes from contrasting grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Plant Science*. 179: 489-498.
- Ding HD, Zhang HJ, Zhu XH, Liu H, Liang JS, Lu B (2012) Involvement of calcium and calmodulin signaling in adaptation to heat stress-induced oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. leaves. *African Journal of Biotechnology*. 11: 3259-3269.
- Divi UK, Rahman T & Krishna P (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology*. 10:151.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pernnigton JS (1971) Stage of development description for soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Crop Science*. 11: 929-931.
- Ferreira, D.F. Sisvar versão 5.3 (Biud 75) (2010) Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. *Lavras, MG, Universidade Federal de Lavras*.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*. 6: 269-279.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1503-1509.
- Hetherington AM & Woodward FI (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*. 424: 901–908.
- Houde M, Dhindsa RS & Sarhan F (1992) A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. *Molecular and General Genetic*. 234: 43-48.
- Hundertmark M, Dimova R, Lengefeld J, Seckler R, Hinch DK (2011) The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from *Arabidopsis thaliana* modulates membrane stability through binding and folding. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 446–453.

- Ismail AM, Hall AE & Close TJ (1999) Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 13566-13570.
- Kim SY & Nam KH (2010) Physiological roles of ERD10 in abiotic stresses and seed germination of *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. 29: 203–209.
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (1994) Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 35: 225–231.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*. 147: 381-390.
- Kulcheski FR, Oliveira LFV, Molina LG, Almerao MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimaraes FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GAG, Margis R (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*. 12: 1-17.
- Labhili M, Joudrier P & Gautier MF (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science*. 112: 219-230.
- Lee SH, Kim JC, Lee MS, Heo WD, Seo HY, Yoon HW, Hong JC, Lee SY, Bahk JD, Hwang I, Cho MJ (1995) Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 21806-21812.
- Liu HT, Gao F, Li GL, Han JL, Liu DL, Sun DY, Zhou RG (2008) The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 55: 760-773.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran L-S P, Nguyen HT (2009) PhysiologRubical and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant & Cell Physiology*. 50: 1260-1276.
- Manfre AJ, Lanni LM & Marcotte WRJ (2006) The *Arabidopsis* group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein ATEM6 is required for normal seed development. *Plant Physiology*. 140: 140–149.
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yohisda T, Kidokoro S, Matsukura S, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto YY, Yoshiwara K, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Identification of *cis*-acting promoter elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Research*. 19: 37–49.
- Munné-Bosch S & Alegre L (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*. 210: 925–931
- Neves-Borges AC, Guimarães-Dias F, Cruz F, Mesquita RO, Nepomuceno AL, Romano E, Loureiro ME, Grossi-de-Sá MF, Alves-Ferreira M (2012) Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. *Genetics and Molecular Biology*. 35: 212-221.
- Nulit R (2012) Over-expression of *Escherichia coli* Transaldolase in the Cytosol of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Tropical Agricultural Science*. 35: 371-379.
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular*

- Biology*. 45: 263–279.
- Oya T, Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Tobita S, Ito O (2004) Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars. *Plant Production Science*. 7: 129-137.
- Park SY, Noh KJ, Yoo JH, Yu JW, Lee BW, Kim JG, Seo HS, Paek NC (2006) Rapid upregulation of *dehydrin3* and *dehydrin4* in response to dehydration is a characteristic of drought tolerant genotypes in barley. *Journal of Plant Biology*. 49: 455-62.
- Park HS, Jeong WJ, Kim EC, Jung Y, Lim JM, Hwang MS, Park EJ, Ha DS, Choi DW (2012) Heat Shock Protein Gene Family of the *Porphyra seriata* and Enhancement of Heat Stress Tolerance by PsHSP70 in *Chlamydomonas*. *Marine Biotechnology*. 14: 332–342.
- Passioura JB (2012) Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? *Functional Plant Biology*. 39: 851–859.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D (1997) Differential accumulation of water stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum*. 99: 153-159.
- Polizel AM, Medri ME, Nakashima K, Yamanaka N, Farias JRB, Oliveira MCN, Marin SRR, Abdelnoor RV, Marcelino-Guimarães FC, Fuganti R, Rodrigues FA, Stolf-Moreira R, Beneventi MA, Rolla AAP, Neumaier N, Yamaguchi-Shinozaki K, Carvalho JFC, Nepomuceno AL (2011) Molecular, anatomical and physiological properties of a genetically modified soybean line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genetics and Molecular Research*. 10: 3641-3656.
- Prášil IT, Prášilová P & Mařík P (2007) Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crops Research*. 102: 1-8.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki (2008) Arabidopsis DREB2A interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell Online*. 20: 1693–1707.
- Reddy AR, Ramakrishna W, Sekhar AC, Ithal N, Babu PR, Bonaldo MF, Soares MB, Bennetzen JL (2002) Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Nagina 22). *Genome*. 45: 204-211.
- Roberts JK & Key JL (1991) Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene. *Plant Molecular Biology*. 16: 671-683.
- Rodrigues FA, Marcolino-Gomes J, Carvalho JFC, Nascimento LC, Neumaier N, Farias JRB, Carazzolle MF, Marcelino FC, Nepomuceno AL (2012) Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genetics and Molecular Biology*. 35: 304-314.
- Rolla AAP, Carvalho JFC, Fuganti-Pagliarini R, Engels C, Rio A, Marin SRR, Oliveira MCN, Beneventi MA, Marcelino-Guimarães FC, Farias JRB, Neumaier N, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nepomuceno AL (2013) Phenotyping soybean plants transformed with *rd29A:AtDREB1A* for drought tolerance in the greenhouse and field. *Transgenic Research (in press)*. 23: 75-87.
- Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T, Schmid J, Korff M (2013) Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*. 64:

- 3201-3212.
- Rorat T (2006) Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 11: 536–556.
- Ruibal C, Salamó IP, Carballo V, Castro A, Bentancor M, Borsani O, Szabados L, Vidal S (2012) Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Science*. 190: 89–102.
- Scharf KD, Siddique M & Vierling E (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing  $\alpha$ -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress & Chaperones*. 6: 225-237.
- Shih MD, Kao MH, Lin SC, Shu TF, Hsieh KL, Chung MC, Tsou TH, Hsing YIC, Hsieh JS (2010) Tissue- and cellular localization of soybean (*Glycine max* L.) seed maturation protein transcripts. *Botanical Studies*. 51: 183-194.
- Shih MD, Hsieh TY, Jian WT, Wu MT, Yang SJ, Hoekstra FA, Hsing YIC (2012) Functional studies of soybean (*Glycine max* L.) seed LEA proteins GmPM6, GmPM11, and GmPM30 by CD and FTIR spectroscopy. *Plant Science*. 196: 152-159.
- Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*. 7: 161–167.
- Singh J, Whitwill S, Lacroix G, Douglas J, Allard EDG, Keller W, Scherthner JP (2009) The use of Group 3 LEA proteins as fusion partners in facilitating recombinant expression of recalcitrant proteins in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. 67: 15–22.
- Stolf-Moreira R, Lemos EGM, Abdelnoor RV, Beneventi MA, Rolla AAP, Pereira SS, Oliveira MCN, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC (2011) Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46: 58-65.
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8: 125.
- Tardieu F (2013) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in Physiology*. 4: 1-11.
- Varshney RK, Hiremath PJ, Lekha P, Kashiwagi J, Balaji J, Deokar AA, Vadez V, Xiao Y, Srinivasan R, Gaur PM, Siddiqui KHM, Town CD, Hoisington DA (2009) A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics*. 10: 523.
- Vítámvás P, Kosová K, Prášilová P, Prášil IT (2010) Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9°C or 17°C in relation to their winter survival. *Plant Breeding*. 129: 611-616.
- Wang Y, Kim SG, Kim ST, Agrawal GK, Rakwal R, Kang KY (2011) Biotic Stress-Responsive Rice Proteome: An Overview. *Journal of Plant Biology*. 54: 219–226.
- Welin BV, Olson A, Nylander M, Palva ET (1994) Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 26: 131–144.
- Xu GY, Rocha PSCF, Wang ML, Xu ML, Cui Y-C, Li LY, Zhu YX, Xia X (2011) A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Planta*. 234: 47–59.
- Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in

- cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 781–803.
- Yamasaki Y, Koehler G, Blacklock BJ, Randall SK (2013) Dehydrin expression in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*. 70: 213-220.
- Yang SY, Shih MD, Lin TP, Hsing YIC (2011) Two soybean (*Glycine max* L.) GmPM proteins reduce liposome leakage during desiccation. *Botanical Studies*. 52: 465-470.
- Ye C, Argayoso MA, Redoña ED, Sierra SN, Laza MA, Dilla CJ, Mo Y, Thomson MJ, Chin J, Delaviña CB, Diaz GQ, and Hernandez JE (2012) Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. *Plant Breeding*. 131: 33-41.
- Zhang W, Zhou RG, Gao YJ, Zheng SZ, Xu P, Zhang SQ, Sun DY (2009) Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 149: 1773-1784.

## 8 CONCLUSÕES GERAIS

As características fisiológicas indicaram que a cultivar BR 16 possui vigor inicial e a cultivar Embrapa 48 tolerância à seca (redução do potencial osmótico), assim como a *AtDREB2A CA* apresentou melhor uso conservativo de água em condições de adequada disponibilidade hídrica. Cultivadas em campo, a cultivar Embrapa 48 apresentou maior produtividade que as outras plantas e, apesar de resultados não significativos, a planta transgênica contendo a construção *AtDREB2A CA* apresentou maiores resultados de números de vagens, números de sementes e produtividade 25,17% superior que a sua isolinha BR 16 em condições de estresse aplicado no estágio vegetativo. Análises que expandam os testes a campo para outras regiões são necessárias para determinar quais as condições climáticas e de solo nos quais os resultados sejam diferenciais entre a linhagem transgênica *AtDREB2A CA* e sua isolinha BR 16.

Os promotores dos genes *LTI*, *HSP26/42*, *Mat1*, *Mat9* e *Glyma11g16120*, selecionados sob déficit hídrico moderado e severo, apresentaram diferentes *cis*-elementos de resposta à seca da cascata ABA-dependente, como ABREs, MYBR e MYCR, que indicaram que a ativação do GUS sob regulação dos promotores dos genes foram dependentes da quantidade e tipo de *cis*-elementos como demonstrado pela alta ativação dos promotores *LTI*, *Mat1*, e *Mat9* em condições ABA. Esses resultados, juntamente com os dados gerados pelo geneinvestigador, indicam que os promotores dos genes *LTI*, *Mat1*, e *Mat9* podem ser utilizados pela engenharia genética como promotores estresse induzidos em estudos de estresses abióticos como déficit hídrico, estresse por metais pesados e em estresses bióticos associados.

A busca por marcadores de expressão para déficit hídrico e estresse por alta temperatura, aplicados isoladamente e de forma combinada, identificou genes que os qualificam para identificação de tolerância em cultivares de soja. Os possíveis marcadores de expressão para déficit hídrico em folhas foram os genes *HSP18.2* (*Glyma14g06900*), *HSP70* (*Glyma17g08020*) e a calmodulina (*Glyma13g09550*), em caules *Mat9* (*Glyma09g31740*) e em raízes a *LEA18*. Já os possíveis marcadores de expressão para o estresse por alta temperatura foram genes *HSP70* e transaldolase-like em folhas, transaldolase em caules e *LEA18* em raízes. O déficit hídrico e o estresse por alta temperatura combinados apresentaram

como marcadores de expressão os genes *Mat9* e *HSP70* em folhas, *LEA18* e transaldolase-like em caules e *LEA18* em raízes.