



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARTINA BIANCA FUHRMANN AOYAGI

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *AtAREB1* E *nsHb-1* EM
SOJA SOB ESTRESSES HÍDRICOS**

Londrina
2019

Universidade Estadual de Londrina



Embrapa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Martina Bianca Fuhrmann Aoyagi

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *AtAREB1* E *nsHb-1* EM
SOJA SOB ESTRESSES HÍDRICOS**

Londrina
2019

MARTINA BIANCA FUHRMANN AOYAGI

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *AtAREB1* E *nsHb-1* EM
SOJA SOB ESTRESSES HÍDRICOS**

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

Orientadora: Dra. Claudete de Fátima Ruas

Coorientadora: Dra. Liliane Marcia Mertz-Henning

Londrina
2019

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

Fuhrmann-Aoyagi, Martina Bianca.

Caracterização dos genes *AtAREB1* e *nsHb-1* em soja sob estresses hídricos / Martina Bianca Fuhrmann-Aoyagi. - Londrina, 2019.
150 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Coorientador: Liliane Marcia Mertz-Henning.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Encharcamento - Tese. 2. Seca - Tese. 3. Sinalização cruzada - Tese. 4. Soja - Tese. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Mertz-Henning, Liliane Marcia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

MARTINA BIANCA FUHRMANN AOYAGI

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *AtAREB1* E *nsHb-1* EM SOJA SOB
ESTRESSES HÍDRICOS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dra. Kelly Pellizzaro
Instituto Agronômico Do Paraná – IAPAR

Londrina, 28 de fevereiro de 2019.

*Dedico este trabalho ao meu avô
Hubert Iepsen, por ser exemplo, me
apoiar e me ensinar a seguir meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Dra. Liliane Marcia Mertz-Henning, por toda paciência, amizade e conhecimentos passados.

À Dra. Claudete de Fátima Ruas e ao Dr. Paulo Maurício Ruas por me aceitarem como orientada e por todos ensinamentos tanto científicos como para vida.

À Dra. Larissa Alexandra Cardoso Moraes por toda ajuda e apoio que me deste nesse período.

À minha família, principalmente ao meu avô Hubert Iepsen, por ser minha figura paterna, meu amigo, meu exemplo de caráter e por sempre me amar, independente de tudo.

Ao meu marido Luciano, por estar sempre ao meu lado e por ser tudo o que sempre esperei em minha vida.

A todos da Ecofisiologia Vegetal, em especial ao técnico Claudinei.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Elizeu, Maurício, Ju, Danilo, Marco, Júlia, Carol, Phill, Lorenço, Natã, Ester, Gabe, Nosa.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

AOYAGI, Martina Bianca Fuhrmann. **Caracterização dos Genes *AtAREB1* e *nsHb-1* em Soja sob Estresses Hídricos**. 2019. 150 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A soja é uma das mais importantes culturas na economia mundial, contudo o estresse por encharcamento do solo tem efeito severo sobre o crescimento e rendimento de plantas cultivadas, pois reduz a disponibilidade de oxigênio, sendo relativamente comum em áreas de cultivo, onde o solo não possui uma drenagem eficiente. No Brasil, grande parte dessas áreas encontram-se na região Sul do Rio Grande do Sul, também conhecida como Terras Baixas, nas quais está sendo introduzida a rotação do arroz com a soja. No entanto, a soja é uma espécie sensível ao encharcamento, portanto a identificação de genes que possam estar associados a mecanismos de tolerância ao encharcamento é importante para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes. Entre os genes que têm recebido destaque em condições de deficiência de oxigênio em diversos organismos, está o gene associado a hemoglobina não simbiote de classe 1 (*nsHb-1*). Além disso, na literatura estudos comprovam a existência de mecanismos moleculares de sinalização cruzada, onde genes responsivos a um determinado estresse podem contribuir para aumentar a tolerância a outros estresses. A partir dessas hipóteses, desenvolve-se esse estudo dividido em dois capítulos. No primeiro, plantas de soja superexpressando o fator de transcrição *AtAREB1* (Abscisic acid–responsive element binding protein – proteína de ligação ao elemento de resposta ao ácido abscísico), que confere tolerância a seca, foram caracterizadas sob condições de encharcamento. Foram comparadas as respostas bioquímicas, moleculares e fisiológicas, tanto na seca, como no encharcamento. Adicionalmente realizou-se um segundo estudo a fim de caracterizar o perfil de expressão do gene *nsHb-1* em soja, sob os estresses por seca e encharcamento. Os resultados obtidos demonstraram que as plantas de soja superexpressando fator de transcrição *AtAREB1* apresentaram desempenho superior em comparação ao seu *background* convencional, a cultivar BR16 no encharcamento. No estresse por encharcamento, as plantas transgênicas se destacaram por apresentar maiores taxas para fotossíntese, eficiência instantânea no uso da água e eficiência instantânea da carboxilação. Observou-se também um mecanismo mais adaptado para o controle de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como uma menor ativação de genes estresse responsivos, como o da rota fermentativa e da produção de alanina. Com relação ao gene da hemoglobina não simbiote em soja, três genes foram selecionados para análise de expressão por meio de RNA-seq e PCR em tempo real, sendo esses os genes Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1, Glyma.20G191200.1. O Glyma.11G121700.1 e o Glyma.11G121800.1 foram positivamente regulados em raízes de soja sob encharcamento, sendo que o segundo gene foi mais fortemente induzido em comparação ao primeiro. Sob seca, o Glyma.11G121700.1 foi induzido em raízes e folhas. O Glyma.20G191200.1, por ser classificado como uma leghemoglobina, não foi ativado nas condições de estresses testadas.

Palavras-chaves: Encharcamento. Seca. Sinalização cruzada. *Glycine max*.

AOYAGI, Martina Bianca Fuhrmann. **Characterization of *AtAREB1* and *nsHb-1* Genes in Soybean under Water Stresses**. 2019. 150 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Soybean is one of the most important crops in the world economy. However, flooding stress has a severe effect on the growth and yield of cultivated plants, as it reduces oxygen availability and it is relatively common in growing areas where the soil does not have efficient drainage. In Brazil, most of these areas are in the southern region of Rio Grande do Sul, also known as Terras Baixas, where rice rotation with soy is being introduced. Although, soybean is susceptible to waterlogging, thus the identification of genes that may be associated with mechanisms of tolerance to waterlogging is important for the development of tolerant genotypes. Among the genes that have received prominence under conditions of oxygen deficiency in several organisms, is the gene associated with class 1 non-symbiotic hemoglobin (*nsHb-1*). Moreover, in the literature, studies have demonstrated the existence of molecular mechanisms of cross-signaling, where genes responsive to one kind of stress can contribute to increasing tolerance to other stresses. Based on these hypotheses, this study is divided into two chapters. In the first, soybean plants overexpressing the transcription factor *AtAREB1* (ABA-responsive element-binding protein), which confers drought tolerance, were characterized under waterlogging conditions. Biochemical, molecular and physiological responses were assessed in both drought and flooding. In addition, a second study was conducted to characterize the expression profile of the *nsHb-1* gene in soybean, under stresses due to drought and flooding. The results showed that the soybean plants overexpressing the transcription factor *AtAREB1* presented a superior performance in comparison to their conventional background, the cultivar BR16 in the waterlogging. In water stress, the transgenic plants showed the highest rates for photosynthesis, instant efficiency in water use and instant efficiency of carboxylation. It was also observed a mechanism more adapted to the control of reactive oxygen species (ROS), as well as lower activation of stress responsive genes, which are involved in the fermentative pathway or in the alanine production route. With respect to the non-symbiotic hemoglobin gene in soybean, three genes were selected for expression analysis by RNA-seq and real-time PCR, these genes being Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1 and Glyma.20G191200.1. Glyma.11G121700.1 and Glyma.11G121800.1 were positively regulated in soybean roots under waterlogging. The second gene is more strongly induced compared to the first. Under drought, Glyma.11G121700.1 was induced in roots and leaves. Glyma.20G191200.1, being classified as leghemoglobin, was not activated under the stress conditions tested.

Keywords: Flooding. Drought. Cross-talking. *Glycine max*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Rota de sinalização do ácido abscísico principal (ABA). (A) Na ausência de ABA, os receptores ABA são inativados e as Proteínas Fosfatase 2C (PP2C) inibem as ações relacionados com as Proteínas Quinases tipo 2 (SnRK2). (B) Na presença de ABA, os receptores ABA, que são proteínas do complexo RCAR/PYR1/PYL que se ligam a ABA e por sua vez inibem a atividade da PP2C, permitindo a ativação de SnRK2s através da autofosforilação. As SnRK2s ativadas então fosforilam seus alvos a jusante, como os fatores de transcrição AREB/ABF, que se ligam ao cis elementos ABRE e modulam a expressão gênica. Eles também podem fosforilar outras proteínas, como transportadores de íons (canais iônicos) e NADPH oxidases. Juntos, esses eventos levam ao estabelecimento da resposta ABA. **Fonte:** Adaptado de de Zelicourt *et al.* (2016).....38
- Figura 4.1** – Variáveis fisiológicas para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Teor de clorofila; B) Fotossíntese; C) Condutância; D) Concentração interna de CO₂; E) Transpiração. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor57

- Figura 4.2 –** Eficiência no uso da água e carboxilação para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Eficiência instantânea no uso da água; B) Eficiência instantânea de carboxilação; C) Eficiência intrínseca no uso da água. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (background convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor.....58
- Figura 4.3 –** Massa seca da folha em conjunto com o pecíolo, caule e raiz, para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Massa seca dos tecidos; B) Massa seca dos tecidos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor.....59
- Figura 4.4 –** Altura de plantas no estágio V3 no último dia de estresse e no estágio reprodutivo. A) Altura em V3; B) Altura em V3; C) Altura no estágio reprodutivo. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor.....61
- Figura 4.5 –** Fotos da linhagem 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1) e da cultivar BR16 (*background* convencional) ao final do estresse no estágio V3 e durante o estágio reprodutivo. **Fonte:** Próprio autor.....62

- Figura 4.6 –** Conteúdo de proteínas solúveis nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de folha para os genótipos; B) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de raiz para os genótipos; C) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de raiz para os tratamentos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey. **Fonte:** Próprio autor.....63
- Figura 4.7 –** Quantificação do conteúdo de H₂O₂ nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de H₂O₂ no tecido de folha; B) Quantificação de H₂O₂ no tecido de raiz para os genótipos; C) Quantificação de H₂O₂ no tecido de raiz para os tratamentos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor.....64
- Figura 4.8 –** Quantificação de enzimas antioxidantes nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de SOD no tecido de folha para os genótipos; B) Quantificação de SOD no tecido de raiz; C) Quantificação da atividade de CAT no tecido de raiz. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo. **Fonte:** Próprio autor.....65

- Figura 4.9 –** Expressão do gene da construção 35S-*AtAREB1* em tecido de folha e raiz nos genótipos submetidos as condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Expressão do gene *AtAREB1* em folha; B) Expressão do gene *AtAREB1* em raiz. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). A normalização da expressão foi realizada com base nos genes endógenos *β -actina* para a condição de encharcamento e seca, adicionalmente foi utilizado o gene endógeno *FYVE* para a condição de seca. **Fonte:** Próprio autor. 67
- Figura 4.10 –** Expressão do gene *NCED* (Glyma15g40070) em tecido de folha e raiz nos genótipos de soja submetidos as condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A calibração foi realizada com base nas plantas do mesmo genótipo na condição controle. *Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). **Fonte:** Próprio autor. 68
- Figura 4.11 –** Expressão dos genes responsivos ao encharcamento e a seca em tecido de folha e raiz nos genótipos de soja submetidos as condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Expressão do gene *ADH* (Glyma.04G240800); B) Expressão do gene *AlaAT1* (Glyma.07G045900); C) Expressão do gene *AlaAT2* (Glyma.01G026700); D) Expressão do gene *SuSy* (Glyma13g17420); E) Expressão do gene *LEA18* (Glyma.17G164200); F) Expressão do gene desidrina (Glyma.09G185500); G) Expressão do gene *HSP70* (Glyma.17G072400). 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). A calibração foi realizada com base nas plantas do mesmo genótipo na condição controle. *Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). **Fonte:** Próprio autor. 69

| | |
|--|-----|
| Figura 5.1 – Fluxograma das atividades realizadas, caracterizado em: Obtenção das sequências que continham o domínio Plant Globin em bancos de dados específicos, classificação das sequências pela elaboração de uma árvore filogenética e por busca em bancos de RNA-seq e a validação dos dados obtidos por RTq-PCR. Fonte: Próprio autor | 95 |
| Figura 5.2 – Árvore filogenética que demonstra a relação entre as sequências de leghemoglobina e hemoglobina não simbiote selecionadas A) árvore filogenética obtida através do MEGA; B) Alinhamento dos motivos obtidos no MEME; C) identificação dos subgrupos. Fonte: Próprio autor | 97 |
| Figura 5.3 – Sequência consenso do domínio de Plant globin em soja, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Lotus japonicus</i> e <i>Medicago trunculata</i> . Fonte: Próprio autor | 98 |
| Figura 5.4 – Expressão relativa (<i>fold-change</i>) dos genes <i>LEA18</i> e <i>ADH</i> por RTq-PCR em soja. Expressão dos genes Glyma.17G164200 (<i>LEA18</i>) e Glyma.04G240800 (<i>ADH</i>) em plantas de soja da cultivar BR16 submetidas as condições de estresse por encharcamento e seca em tecido de folha (A) e raiz (B). A calibração foi realizada pelas plantas na condição controle. * Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Fonte: Próprio autor | 103 |
| Figura 5.5 – Expressão relativa (<i>fold-change</i>) dos genes de hemoglobina não simbiótica por RTq-PCR em soja. A expressão de Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1 e Glyma.20G191200.1 em plantas de soja da cultivar BR16 submetidas as condições de estresse por encharcamento e seca em tecido de folha (A) e raiz (B). A calibração foi realizada pelas plantas na condição controle. * Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Fonte: Próprio autor | 103 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1** – Design de Primers para RTq-PCR. Identificação, sequências de primers e eficiência de amplificação. **Fonte:** Próprio autor 55
- Tabela 5.1** – Identificação de hemoglobina não simbiótica em soja. Identificação no modelo antigo (Gene Model V9.0) e atual (G.Max Wm82.A2.V1) e anotação do gene. **Fonte:** Próprio autor 89
- Tabela 5.2** – Design de *Primers* para RTq-PCR. Identificação, sequências de *primers* e eficiência de amplificação. **Fonte:** Próprio autor 93
- Tabela 5.3** – Dados de expressão de genes codificadores de hemoglobinas em soja. Dados provenientes de bibliotecas de RNA-seq de raiz de soja sob hipóxia por diferentes períodos de exposição ao estresse, em duas cultivares BR 4 (sensível) e Embrapa 45 (moderadamente tolerante). A: 0,5 horas; B: 4 horas; C: 28 horas de hipóxia. Valores expressos em *Fold-Change*. Genes diferencialmente expressos: *fold-change* ≥ 2 (*up*), ≤ -2 (*down*); adj. $p \leq 0,01$; RPM ≥ 9 (conjuntos de dados de controle ou de estresse). **Fonte:** Próprio autor 100
- Tabela 5.4** – Dados de expressão de genes codificadores de hemoglobinas em soja. Dados provenientes de bibliotecas de RNA-seq de folha e raiz soja sob seca por diferentes períodos de exposição ao estresse, em duas cultivares BR16 (sensível) e Embrapa 48 (moderadamente tolerante). A: 25 a 50 minutos; B: 75 a 100 minutos; C: 125 a 150 minutos. Valores expressos em *Fold-Change*. Genes diferencialmente expressos: *fold-change* ≥ 2 (*up*), ≤ -2 (*down*); adj. $p \leq 0,01$; RPM ≥ 9 (conjuntos de dados de controle ou de estresse). **Fonte:** Próprio autor 101

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| A | <i>Taxa fotossintética</i> |
| ABA | <i>Ácido abscísico</i> |
| ABRC | <i>Complexo Responsivo Mínimo a ABA</i> |
| ADH | <i>Álcool desidrogenase</i> |
| ADP | <i>Adenosina difosfato</i> |
| AlaAT | <i>Alanina Aminotransferase</i> |
| ANP | <i>Anaerobic polypeptides (Polipeptídeos anaeróbicos)</i> |
| AREB | <i>ABA responsive element-binding protein (Proteína de ligação ao elemento responsivo ao ABA)</i> |
| ATP | <i>Adenosina trifosfato</i> |
| B-Zip | <i>Basic Leucine Zipper Domain (Domínio básico do zíper da leucina)</i> |
| Cab21 | <i>Chlorophyll a/b binding protein (Proteína de ligação a clorofila a/b)</i> |
| CaMV | <i>Cauliflower mosaic virus (Vírus-do-mosaico-da-couve-flor)</i> |
| CAT | <i>Catalase</i> |
| CE | <i>Elemento de Acoplamento</i> |
| C _i | <i>Concentração interna de CO₂</i> |
| DNA | <i>Ácido Desoxirribonucleico</i> |
| DRE | <i>Elemento responsivo a desidratação</i> |
| E | <i>Transpiração</i> |
| EMBRAPA | <i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i> |
| ERF | <i>Ethylene responsive factor (Fator de resposta ao etileno)</i> |
| EUA | <i>Eficiência Instantânea no Uso da Água</i> |
| EiUA | <i>Eficiência Intrínseca no Uso da água</i> |
| EIC | <i>Eficiência Instantânea de Carboxilação</i> |
| FBN | <i>Fixação Biológica de Nitrogênio</i> |
| TF | <i>Transcription factor (Fator de transcrição)</i> |
| GABA | <i>Gamma-aminobutyric acid (Ácido gama-aminobutírico)</i> |
| GDC | <i>Glutamato descarboxilase</i> |
| GM | <i>Geneticamente modificado</i> |
| G _s | <i>Condutância estomática</i> |
| Hb | <i>Hemoglobina</i> |

| | |
|----------|--|
| HSP | <i>Heat shock protein (Proteína de choque térmico)</i> |
| LDH | <i>Lactato desidrogenase</i> |
| LEA18 | <i>Late embryogenesis abundant protein (Proteína abundante na embriogênese tardia)</i> |
| NAD/NADH | <i>Dinucleótido de nicotinamida e adenina</i> |
| NBT | <i>Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)</i> |
| NO | <i>Óxido nítrico</i> |
| nsHb | <i>Non-symbiotic hemoglobin (Hemoglobina não simbiote)</i> |
| nsHb-1 | <i>Class 1 Non-symbiotic hemoglobin (Hemoglobina não simbiote de classe 1)</i> |
| PDC | <i>Piruvato descarboxilase</i> |
| pH | <i>Potencial hidrogeniônico</i> |
| RNA | <i>Ácido ribonucleico</i> |
| RNA-seq | <i>Sequenciamento de RNA</i> |
| ROS | <i>Espécies reativas de oxigênio</i> |
| RTq-PCR | <i>PCR em tempo real</i> |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)</i> |
| SOD | <i>Superóxido dismutase</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 28 |
| 2.1 | A CULTURA DA SOJA NO BRASIL E NO MUNDO | 28 |
| 2.2 | ESTRESSE ABIÓTICO POR ENCHARCAMENTO NA SOJA | 29 |
| 2.3 | MECANISMOS DE RESPOSTAS AO ENCHARCAMENTO | 31 |
| 2.4 | GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DAS PLANTAS AO ENCHARCAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A BIOTECNOLOGIA | 34 |
| 2.4.1 | Fator de Transcrição AREB e Mecanismo de Regulação | 36 |
| 2.5 | SINALIZAÇÃO CRUZADA (CROSS-TALK) ENTRE OS ESTRESSES POR ENCHARCAMENTO E SECA | 39 |
| 2.6 | HIPÓTESES DO ESTUDO | 41 |
| 3 | OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 41 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 42 |
| 4 | ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PLANTAS DE SOJA GM COM A CONSTRUÇÃO 35S-AβAREB1 SOB ESTRESSE POR ENCHARCAMENTO E SECA | 43 |
| 4.1 | RESUMO | 43 |
| 4.2 | INTRODUÇÃO | 44 |
| 4.3 | MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 4.3.1 | Obtenção do Material Vegetal | 48 |
| 4.3.2 | Coleta de Dados | 49 |
| 4.3.2.1 | Análises fisiológicas | 49 |
| 4.3.3 | Análises Bioquímicas | 51 |
| 4.3.4 | Quantificação da Expressão de Genes por PCR em Tempo Real | 52 |
| 4.3.5 | Estatística | 56 |
| 4.4 | RESULTADOS | 56 |

| | | |
|---------|--|------------|
| 4.4.1 | Análise Fisiológicas | 56 |
| 4.4.2 | Análise Bioquímicas..... | 63 |
| 4.4.3 | Análise dos Dados de Expressão Gênica | 66 |
| 4.5. | Discussão..... | 70 |
| 4.6 | CONCLUSÕES | 79 |
| | | |
| 5 | ARTIGO B: PERFIL DE EXPRESSÃO DA HEMOGLOBINA NÃO SIMBIONTE CLASSE 1 (<i>nsHb-1</i>) EM SOJA SOB CONDIÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO POR SECA E ENCHARCAMENTO | 80 |
| 5.1 | RESUMO | 80 |
| 5.2 | INTRODUÇÃO | 81 |
| 5.3 | MATERIAL E MÉTODOS | 85 |
| 5.3.1 | Busca dos Genes com Domínio <i>Plant Globin</i> em Bancos de Dados | 85 |
| 5.3.2 | Árvore Filogenética | 86 |
| 5.3.3 | Análise da Expressão em Bancos de RNA-Seq..... | 87 |
| 5.3.4 | Seleção de Genes para Validação por PCR em Tempo Real..... | 88 |
| 5.3.5 | Ensaio de Validação por PCR em Tempo Real | 90 |
| 5.3.5.1 | Obtenção do material vegetal..... | 90 |
| 5.3.5.2 | Expressão gênica por PCR em tempo real..... | 91 |
| 5.4 | Resultados | 96 |
| 5.4.1 | ÁRVORE FILOGENÉTICA..... | 96 |
| 5.4.2 | Análise dos Bancos de RNA-Seq..... | 99 |
| 5.4.3 | Validação dos Resultados de Rna-Seq por Pcr em Tempo Real..... | 102 |
| 5.5 | DISCUSSÕES | 104 |
| 5.6 | CONCLUSÕES | 108 |
| | | |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 109 |
| | | |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 110 |
| | | |
| | APÊNDICES..... | 144 |
| | APÊNDICE A – Informações sobre as sequências com domínio <i>Plant globin</i>..... | 144 |

1 INTRODUÇÃO

As plantas quando submetidas a condições de excesso de água no solo sofrem com a deficiência de oxigênio, estresse que pode ser caracterizado pela baixa concentração de oxigênio (hipóxia) ou ausência (anóxia) do mesmo (DREW, 1997). A deficiência de oxigênio acarreta uma série de distúrbios no metabolismo das plantas que se manifestam por meio de alterações no crescimento e desenvolvimento (BORELLA *et al.*, 2014). A ausência de oxigênio diminui a produção de ATP (adenosina trifosfato), o que gera diversas consequências para o metabolismo celular primário, com reflexos nas vias do metabolismo secundário (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004), reduzindo também drasticamente o desenvolvimento da planta (WANG; KOMATSU, 2017) e sua produtividade (AZOOZ; AHMADM, 2016).

Na América do Sul estima-se a existência de 200 milhões de hectares de áreas inundáveis (JUNK, 1993). No Brasil, cerca de 33 milhões de hectares de solos estão sujeitos ao encharcamento temporário (SANTOS, 1999). Parte dessas áreas, denominadas Terras Baixas ou Áreas de Várzea, encontram-se na região Sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, o qual possui aproximadamente 5,4 milhões de hectares sujeitos ao encharcamento do solo (PINTO; MIGUEL; PAULETTO, 2017). Tradicionalmente essas áreas eram ocupadas com o cultivo do arroz irrigado, entretanto, nos últimos anos, a cultura da soja surgiu como uma alternativa para rotação de culturas. A rotação de culturas permite a melhoria do sistema, pois espécies distintas apresentam necessidades nutricionais diversificadas, bem como contribuem com resíduos vegetais de maneira singular para o solo (VEDELAGO, 2014), além de quebrar o ciclo de reprodução de muitas pragas e doenças (RATNADASS *et al.*, 2012) e gerar uma diversificação na renda do produtor (VERNETTI JÚNIOR *et al.*, 2009). Embora a soja esteja sendo cultivada nessas regiões, perdas de produtividade são frequentemente registradas em função desta não ser uma cultura adaptada ao encharcamento do solo.

Estudos visando a identificação de genes que possam conferir tolerância ao estresse por encharcamento tornam-se necessários, com a finalidade de viabilizar o

desenvolvimento de cultivares mais tolerantes. Na literatura, inúmeros trabalhos têm sido publicados visando a prospecção de genes para tolerância aos estresses abióticos como seca (ALEXIEVA *et al.*, 2001; CASAGRANDE *et al.*, 2001; HONNA *et al.*, 2016; HOSSAIN *et al.*, 2016; LATA; PRASAD, 2011; RECCHIA *et al.*, 2013; FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017; TAJI *et al.*, 2002), salinidade (HANIN *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2015; WANG; VINO CUR; ALTMAN, 2003), temperaturas elevadas (WANG; VINO CUR; ALTMAN, 2003) e até mesmo de acúmulo de metais, como zinco, níquel e chumbo (PRASAD; FREITAS, 2003).

Entretanto, trabalhos que visam identificar genes associados a hipóxia ou encharcamento do solo ainda são incipientes, sendo em sua maioria realizados com arroz (NAIDOO, 1983; NASH; GRAVES, 1993; NISHIUCHI *et al.*, 2012; SINGH; MACKILL; ISMAIL, 2014; VAN VERK; BOL; LINTHORST, 2011). Até o momento, as informações geradas dos genes identificados, caracterizados e envolvidos nas respostas ao encharcamento e a outras características complexas estão longe de serem suficientes para o entendimento do *pool* gênico, das vias de resposta e de como é a conexão genótipo-fenótipo (NAKAYAMA *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos com genes para obtenção de plantas mais tolerantes aos estresses abióticos se baseiam na superexpressão de fatores de transcrição (TF), os quais são capazes de regular a expressão de um grande número de genes, promovendo mudanças expressivas nas plantas. Destaca-se entre os TF, o TF *AtAREB1* (Proteína de ligação ao elemento responsivo ao ABA). Plantas de soja superexpressando o TF de *AREB1* de *Arabidopsis thaliana* apresentaram desempenho superior sob seca, em ensaios conduzidos em casa de vegetação e a campo (LEITE *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2015; FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017; NAKASHIMA *et al.*, 2018). Por atuar na regulação de um grande número de genes e ativar diversas estratégias de proteção celular (YAMAGUCHI; FUNAMOTO; SHIGYO, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2010), esse TF pode também refletir na ativação de vias de resposta ao estresse por encharcamento, através de mecanismos de sinalização cruzada, onde um gene capaz de conferir tolerância a determinado estresse pode também contribuir para o aumento da tolerância a outro estresse. Mecanismos de sinalização cruzada para diferentes estresses abióticos já foram

descritos na literatura, como no trabalho de Chen *et al.* (2016), o qual descreveu TFs das famílias AP2 (*Activating protein 2*), bZIP (*Basic Leucine Zipper Domain*), MYB e NAC. Na pesquisa de Syed *et al.* (2015) a expressão dos genes *SUB1* (*Submergence 1*), *PRR7* (*Pseudo-Response Regulators 7*), *TOC1* (*Timing Of Cab Expression 1*), responsivos ao estresse por seca e encharcamento. Sendo assim, é possível que o TF *AtAREB1*, quando superexpresso na planta, possa conferir um aumento da tolerância ao encharcamento.

Além disso, uma proteína que tem merecido destaque nos mecanismos de resposta a deficiência de oxigênio é a hemoglobina não simbiote de classe 1 (*nsHb-1*). Em plantas a *nsHb-1* já foi descrita em diversas espécies como *Arabidopsis thaliana* (HUNT *et al.*, 2002), arroz (OHWAKI *et al.*, 2005; LIRA-RUAN; RUIZ-KUBLI; ARREDONDO-PETER, 2011), milho (SÁENZ-RIVERA *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2008), cevada (TAYLOR *et al.*, 1994), alfafa (DORDAS *et al.*, 2003), tomate (WANG *et al.*, 2003), beterraba (LEIVA-ERIKSSON *et al.*, 2014), dentre outras espécies (VINOGRADOV; HOOGEWIJS; ARREDONDO-PETER, 2011). Essa classe de hemoglobinas está envolvida na rota metabólica do óxido nítrico (NO), durante períodos prolongados de baixa concentrações de O₂, chamado de ciclo *nsHb/NO* (DORDAS, 2009). Essa enzima, além de fazer o controle dos níveis de NO, mantendo o balanço *redox* na planta, também contribuiu para tolerância a hipóxia aumentando a reciclagem de NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo) para que a glicólise continue gerando ATP (GUPTA *et al.*, 2011).

Dessa forma, esse estudo está dividido em dois artigos, o primeiro tem por objetivo caracterizar plantas transgênicas contendo a construção 35S-*AtAREB1* sob estresse por encharcamento, considerando aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, comparando com a respectiva cultivar convencional BR16. No segundo trabalho buscou-se caracterizar os genes da hemoglobina não simbiote de classe 1 (*nsHb-1*) em soja sob estresse por seca e encharcamento, utilizando ferramentas de bioinformática em conjunto com a avaliação da expressão gênica por meio de RNA-seq e PCR em tempo real.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DA SOJA NO BRASIL E NO MUNDO

A soja (*Glycine max*) é uma espécie autógama, anual (PRATAP *et al.*, 2012), herbácea incluída na subdivisão *Angiospermae*, classe *Magnoliopsida* (Dicotiledônea), ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, gênero *Glycine* L (ROCHA, 2009), pertencente a mesma subfamília que o feijão, ervilha e lentilha (AHMED; HASAN, 2014).

No setor do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento mais expressivo (DALL'AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010; HIRAKURI; LAZAROTTO, 2014), sendo uma das mais importantes culturas na economia mundial (GILLMAN *et al.*, 2017). Seus grãos são amplamente utilizados pela agroindústria, para a produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal, na indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso dessa oleaginosa como fonte alternativa de biocombustível (FREITAS, 2011; CHURASIA; SINGH; KUMAR, 2016).

Aproximadamente 336 milhões de toneladas de soja são produzidas mundialmente (EMBRAPA, 2018). Os países com maior produção são os Estados Unidos, Brasil e Argentina (PEGANO; MIRANSARI, 2016), os quais concentram 84,41% da produção global da cultura (COSTA, 2018). Com o aumento populacional, que acarreta num maior consumo de carne, e conseqüentemente uma maior demanda de farelo, conjuntamente com o fortalecimento do mercado asiático, a soja será uma das *commodities* com crescimento mais expressivo ao longo dos anos (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011).

No Brasil, a soja e o milho permanecem como as principais culturas no país, sendo que os dois produtos correspondem a quase 90% do que é produzido (CONAB, 2018). Segundo o levantamento de grãos do mês de dezembro da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2017/18 de soja alcançou uma área de 35.149,2 hectares, com a média de produção de 3.433 kg.ha⁻¹ e uma produção total de 119.281,7 toneladas. Sendo os maiores produtores Mato Grosso,

Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2018). Desta produção, 68,1 milhões de toneladas são exportados, e o restante permanece para o consumo interno, sendo na sua grande maioria utilizado para produção de farelo (EMBRAPA, 2018; MAPA, 2018).

O crescimento da cultura da soja no país deve-se principalmente aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo bem como o forte incremento na área de cultivo (FRANÇA-NETO *et al.*, 2016). A mecanização e o desenvolvimento de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões, o desenvolvimento de estratégias tecnológicas relacionadas ao manejo de solos, ao manejo de adubação e calagem, ao manejo de pragas e doenças, além da identificação e solução para os principais fatores responsáveis por perdas no processo de colheita, são fatores promotores do crescimento da cultura (FREITAS, 2011).

Porém, culturas produzidas a campo estão expostas a ambientes variáveis que podem promover dificuldades para o crescimento e desenvolvimento da planta, resultando em perdas produtivas e econômicas significativas (KULCHESKI, 2013). Assim, a capacidade da planta de se desenvolver em condições de estresse ambiental, torna-se um fator chave para aumentar o rendimento das culturas.

2.2 ESTRESSE ABIÓTICO POR ENCHARCAMENTO NA SOJA

O estresse por encharcamento tem efeito severo sobre o crescimento e rendimento de plantas cultivadas (NAKAYAMA *et al.*, 2017), sendo comum em áreas de cultivo onde as características do solo fazem com que sua drenagem seja ineficiente. A principal consequência do encharcamento do solo é a deficiência de oxigênio (O₂) (VOESENEK *et al.*, 2006). Sabe-se que a difusão de O₂ na água é drasticamente reduzida (SASIDHARAN; VOESENEK, 2015), pois o coeficiente de difusão de O₂ é aproximadamente 10.000 vezes menor que na atmosfera (SOMERVILLE; PROCTOR, 2013).

A maioria das espécies de plantas não são adaptadas para sobreviverem à submersão ou encharcamento prolongado do solo (LORETI; VAN VEEN; PERATA,

2016). As plantas dependem do oxigênio para produzirem energia, portanto sua disponibilidade é necessária. Mudanças na sua acessibilidade levam a rearranjos metabólicos drásticos e a sua ausência leva a morte de organismos aeróbicos associados à planta (BANTI *et al.*, 2013).

Quando o oxigênio se torna limitado para as funções respiratórias das plantas, evento chamado de hipóxia, ocorre uma drástica redução da produção normal de ATPs, oriundos da fosforilação oxidativa. Enquanto na ausência completa de oxigênio, chamada de anóxia, não há produção de ATP por via da fosforilação oxidativa (SOUSA; SODEK, 2002; VARTAPETIAN *et al.*, 2014). Tanto hipóxia quanto a anóxia desencadeiam uma reprogramação extensiva da expressão gênica (PERATA; ALPI, 1993).

Além disso, o encharcamento na soja pode causar clorose, necrose, descoloração, defoliação, redução da fixação de nitrogênio e morte da planta (WU *et al.*, 2017), reduzindo drasticamente o crescimento (WANG *et al.*, 2017) e produtividade da cultura (AZOOZ; AHMADM, 2016). Ainda, a falta de O₂ no sistema radicular da planta de soja, além de inibir a fixação simbiótica, também inibe a absorção de nitrogênio e outros minerais, prejudicando o crescimento das raízes e a nodulação (SALLAM; SCOTT, 1987).

No Brasil, cerca de 33 milhões de hectares de solos estão sujeitos ao encharcamento temporário (SANTOS, 1999). Parte dessas áreas, denominadas Terras Baixas ou Áreas de Várzea, encontram-se na região Sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, o qual possui aproximadamente 5,4 milhões de hectares de Terras Baixas (PINTO; MIGUEL; PAULETTO, 2017). Tradicionalmente essas áreas vinham sendo destinadas ao monocultivo de arroz irrigado. Porém, visando aumentar a sustentabilidade do sistema, nos últimos anos vem ocorrendo o incremento da cultura de soja em rotação com a cultura do arroz (VENTURINI; 2014). A rotação de culturas é uma prática de interesse para o produtor, principalmente para o aumento da renda e também auxiliando na quebra do ciclo de pragas e plantas daninhas, bem como, contribui com a deposição de resíduos vegetais no solo (VEDELAGO, 2014).

Embora seja considerada uma cultura sensível ao encharcamento do solo, a soja vem sendo estudada como alternativa para áreas de várzea (RIBAS-CARBO *et al.*, 2005), levando a necessidade de se desenvolver estratégias para o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes.

2.3 MECANISMOS DE RESPOSTAS AO ENCHARCAMENTO

Os mecanismos de tolerância das plantas ao encharcamento do solo baseiam-se em uma série de características e estratégias adaptativas que melhoram a troca de gases e mantêm a produção de energia pela planta (ARMSTRONG; BRÄDLE; JACKSON, 1994).

A adaptação à troca de gases com o meio ambiente é essencial para evitar hipóxia intracelular. Para isso, as plantas podem induzir e/ou constitutivamente desenvolver aerênquima, espaços conectados longitudinalmente, que facilitam a difusão de gases na planta (TAKAHASHI *et al.*, 2014). Esse mecanismo geralmente é combinado com uma mudança na arquitetura da raiz para minimizar a distância entre a superfície aérea e as raízes inundadas, através do surgimento de estruturas como raízes adventícias, as quais visam captar oxigênio da superfície, durante o período de exposição ao encharcamento nas raízes (STEFFENS; RASMUSSEN, 2016).

Em uma estratégia alternativa, a planta pode também entrar em um estado de inatividade (quiescência), para ser revertido assim que o encharcamento retroceda (AKMAN *et al.*, 2012; VOESENEK; BAILEY-SERRES, 2015). Essa é também uma tática de difícil adoção, visto que a energia e a utilização de carbono devem ser reduzidas ao mínimo, para fazer reservas por muito tempo, enquanto necessitam simultaneamente ser suficientes para manter a integridade celular.

No momento em que a planta é exposta a um decréscimo de oxigênio ocorre a indução do metabolismo fermentativo, permitindo que a planta continue a glicólise para produção de ATP (PERATA; ALPI, 1993). Nessas condições, as plantas têm que sobreviver com a pequena quantidade de ATP que ainda pode ser produzido através da glicólise, pois quando o ciclo de Krebs e cadeia transportadora de

elétrons não estão completamente ativos na falta de oxigênio, há uma diminuição na produção de ATPs, passando de 36 ATPs numa situação de normóxia para 2 ATPs durante a hipóxia. A falta da reoxidação mitocondrial do NADH coloca a glicólise em risco de parar logo após a exposição a baixas condições de oxigênio, a menos que um mecanismo alternativo para a reoxidação do NADH seja ativado (KENNEDY; RUMPHO; FOX, 1992; RICARD *et al.*, 1994). Sob a deficiência de oxigênio, o metabolismo da planta usa piruvato como substrato inicial para alternar duas vias principais de reoxidação de NADH: as fermentações por etanol e por ácido láctico (GEIGENBERGER, 2003).

A primeira rota de fermentação ativada é a do ácido láctico, na qual ocorre uma rápida ativação da lactato desidrogenase (LDH) que catalisa a redução do piruvato para o lactato, resultando na regeneração de NAD^+ (RIVOAL; RICARD; PRADET, 1991). A produção de lactato acidifica o citoplasma, resultando em um valor ótimo de pH para a atividade PDC (piruvato descarboxilase), com a conseqüente ativação da via de fermentação do etanol para evitar qualquer acidificação citoplasmática deletéria (FELLE, 2005; ROBERTS *et al.*, 1984). A interação entre a fermentação láctica e etanólica leva ao controle rigoroso do pH citosólico das células (ROBERTS *et al.*, 1984).

Já a fermentação etanólica consiste na conversão de piruvato em etanol. As duas enzimas responsáveis pela fermentação etanólica são a PDC, que converte piruvato em acetaldeído mais dióxido de carbono (CO_2) e a álcool desidrogenase (ADH), que converte o acetaldeído em etanol, regenerando NAD^+ (TADEGE; KUHLEMEIER, 1997; MELLEMA *et al.*, 2002). Além da importância dessa conversão para a geração de energia, a ADH é de extrema importância para evitar a toxicidade celular, pois o acetaldeído é altamente tóxico para a célula, tendo que ser rapidamente convertido em etanol (BAILEY-SERRES; VOESENEK; 2010).

Um metabolismo alternativo, que também é importante para o processo que pode reciclar NAD(P)H a NAD(P)^+ durante a hipóxia, é o que induz a nitrato redutase levando a formação de óxido nítrico (NO). No entanto o acúmulo de NO na célula pode ser tóxico (DORDAS; RIVOAL; HILL, 2003). Neste contexto, o papel da nsHb-1 e o NO também foram destacados em muitas espécies de plantas, através de um

ciclo chamado de ciclo nsHb/NO (ANDERSSON *et al.*, 1996; IGAMBERDIEV *et al.*, 2005). O NO é altamente reativo e sua reação com a nsHB-1 é considerada como uma rota importante para a sua desintoxicação (PERAZZOLLI; ROMERO-PUERTAS; DELLEDONNE, 2006). O NO produzido em baixos níveis de O₂ através da ativação da enzima nitrato redutase, reage com nsHbO₂ e produz NO₃. Essas reações oxidam NAD(P)H, mantendo o estado *redox* da célula e auxilia na manutenção da glicólise (DORDAS, 2009; MARICLE *et al.*, 2014).

Outra rota que ocorre durante situações de hipóxia é a de reconfiguração do metabolismo de nitrogênio/carbono primário, a qual é chamada de ciclo da alanina (DREW, 1997; BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). A enzima que participa dessa rota é chamada de alanina aminotransferase (AlaAT), que catalisa a conversão reversível de piruvato e glutamato em alanina e oxoglutarato (ROCHA *et al.*, 2010). Essa rota realiza a conversão de piruvato em alanina, a qual economiza esqueletos de carbono e nitrogênio (pelo grupamento amino) que, de outro modo, seriam consumidos pela via fermentativa, evitando assim uma escassez de disponibilidade de carbono (RICOULT *et al.*, 2005) e de nitrogênio (MIYASHITA; GOOD, 2008). Quando a planta retorna ao estado de normóxia, a alanina é convertida novamente em piruvato pela AlaAT, que por sua vez pode ser utilizado no Ciclo de Krebs, evitando a escassez desta molécula. Já o nitrogênio liberado é utilizado para a manutenção da sobrevivência da planta (RICOULT *et al.*, 2006).

É de expressiva importância aprofundar o conhecimento atual sobre a regulação da transcrição de genes, metabólitos e vias fermentativas, e suas interações durante respostas ao encharcamento e baixa disponibilidade de O₂ (GIBBS *et al.*, 2011; LICAUSI *et al.*, 2011). Esses dados podem contribuir para caracterização e geração de cultivares mais adaptadas, tornando assim, mais eficiente o atual modelo produtivo de áreas sujeitas ao encharcamento do solo, que atualmente é ocupado, em grande parte, pelo monocultivo de arroz irrigado (BORELLA *et al.*, 2017).

2.4 GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA DAS PLANTAS AO ENCHARCAMENTO E SUA RELAÇÃO COM A BIOTECNOLOGIA

Os produtos gênicos detectados no estresse por encharcamento podem ser classificados em quatro grupos: diversos genes metabólicos, incluindo aqueles previamente identificados como polipeptídeos anaeróbios (ANPs); componentes de transdução de sinal, incluindo quinases e fatores de transcrição (TFs); proteínas relacionadas à defesa e proteínas envolvidas na estrutura do DNA e regulação pós-transcricional (DENNIS *et al.*, 2000).

Genes que regulam a expressão de uma única proteína também já foram identificados por terem papel importante nos mecanismos de resposta a hipóxia, por exemplo, a hemoglobina não simbiote de classe 1 (*nsHb-1*) (DORDAS *et al.*, 2003; DORDAS *et al.*, 2004; NAKAYAMA *et al.*, 2017), age em uma rota na qual ocorre a desintoxicação de NO, a qual regenera NAD⁺ para ser utilizado na quebra de glicose (STOIMENOVA *et al.*, 2007). A expressão do gene *nsHb-1* em hipóxia já foi demonstrada em *A. thaliana* (HUNT *et al.*, 2002), cevada (TAYLOR *et al.*, 1994), carvalho (PARENT *et al.*, 2008) e arroz (LIRA-RUAN; RUIZ-KUBLI; ARREDONDO-PETER, 2002).

No estudo de Thiel *et al.* (2011), plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene da *nsHb-1* apresentaram um rearranjo transcricional, resultando numa pré-adaptação da planta a hipóxia e ao estresse osmótico, assim como, originou sementes capazes de alterar seu metabolismo para economizar energia em situações de baixa concentração de O₂. Em trabalho conduzido por Zhao *et al.* (2008), o gene *nsHb-1* do milho foi superexpresso em plantas de tabaco e resultou em um aumento da tolerância das plantas ao encharcamento, estresse osmótico e salino. A superexpressão em alfafa do gene *nsHb-1* isolado de cevada resultou em aumento da atividade antioxidante em raízes durante a hipóxia (DORDAS,2009). Dessa mesma forma, quando superexpresso em *A. thaliana*, o gene *nsHb-1* de espinafre reduziu o acúmulo de NO nas raízes (BAI *et al.*, 2016). Todos esses trabalhos demonstram o potencial do gene *nsHb-1* em aumentar a tolerância ao encharcamento em diversas espécies.

Além do gene *nsHb-1*, a categoria de genes chamados de fatores de transcrição (TFs) vem se destacando em estudos associados a estresses abióticos. Os TFs são proteínas que se ligam a promotores no DNA e estimulam a expressão de vários genes de resposta e/ou defesa a estresses bióticos e abióticos (LATA; YADAV; PRASAD, 2011; WANG *et al.*, 2016). No geral, estudos recentes sugerem que as vias de sinalização aos estresses abióticos, como encharcamento e hipóxia, são controladas através de vários sinais e proteínas em uma rede altamente conectada (SCHMIDT *et al.*, 2017), envolvendo um número grande de genes. Dessa maneira, por promoverem a ativação da expressão de mais de um gene de resposta ao estresse, os TFs se tornam alvos interessantes para serem estudados.

Os TFs pertencentes as famílias MYC, MYB, AP2/ERF e NAC foram relatados como capazes de regular a expressão de ADH em *Arabidopsis* (ABE *et al.*, 2003; CHRISTIANSON *et al.*, 2009; PAPDI *et al.*, 2008). No trabalho de Nakayama *et al.* (2017) com plantas de soja submetidas a hipóxia, dois genes de TFs da família ABF/AREB (Glyma.06G040400 e Glyma.19G122800) foram mais expressos na condição de hipóxia após 28 horas. Através desses e outros estudos, vem sendo demonstrada a importância dos TFs no estresse por deficiência de oxigênio, sendo esses possíveis alvos na obtenção de plantas mais tolerantes às condições de encharcamento (REJEB; PASTOR; MAUCH-MANI, 2014).

As técnicas de biotecnologia, como o desenvolvimento de plantas transgênicas, constituem uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de plantas com maior tolerância a estresses. Entretanto, embora muitos avanços tenham sido realizados, até o momento a maioria das plantas transgênicas disponíveis comercialmente possuem características associadas a resistência a herbicidas e a insetos (WANG *et al.*, 2017). Muitos artigos já foram publicados acerca da identificação e validação de genes para conferir tolerância aos estresses abióticos, sendo em sua maioria genes para estresses como seca (ALEXIEVA *et al.*, 2001; CASAGRANDE *et al.*, 2001; HONNA *et al.*, 2016; HOSSAIN *et al.*, 2016; LATA; PRASAD, 2011; RECCHIA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012; TAJI *et al.*, 2002), salinidade (HANIN *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2015; WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003), temperaturas elevadas (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003) e até

mesmo de acúmulo de metais (PRASAD; FREITAS, 2003). No entanto os estudos com estresse sob hipóxia ou encharcamento ainda são incipientes, sendo a maioria dos trabalhos realizados com arroz (BLANKE; COOKE, 2004; NAIDOO, 1983; NASH; GRAVES, 1993; NISHIUCHI *et al.*, 2012; SINGH; MACKILL; ISMAIL, 2014; VAN VERK; BOL; LINTHORST, 2011).

Trabalhos com genes para tolerância ao encharcamento em soja ainda são escassos (NAKAYAMA *et al.*, 2017; VALLIYODAN *et al.*, 2014). Nesse sentido, a descoberta de genes e rotas metabólicas associadas a tolerância ao encharcamento, aliada às ferramentas biotecnológicas como a transgenia, a engenharia genética de precisão, ou ainda, o uso de marcadores moleculares, poderão resultar em genótipos de soja capazes de tolerar e sobreviver ao estresse.

2.4.1 Fator de Transcrição AREB e Mecanismo de Regulação

Os TFs conhecidos como AREB/ABF (*ABA-Responsive Element Binding Protein/ABRE-Binding Factor*) são pertencentes a família bZIP, a qual possui diversos genes com papel importante nos mecanismos de tolerância a estresses abióticos (CHOI *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2010). Três membros dessa família, conhecidos como AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 e ABF3 são altamente induzidos por ABA e estão envolvidos na sinalização da resposta a estresses osmóticos, como salinidade e desidratação em plantas (CHOI *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004; FUJITA *et al.*, 2005; FURIHATA *et al.*, 2006, UNO *et al.*, 2016). Já no encharcamento, dois genes AREB/ABF (Glyma.06G040400 e Glyma.19G122800) foram descritos por Nakayama *et al.* (2017) apresentando um aumento de sua expressão após 28 horas de hipóxia.

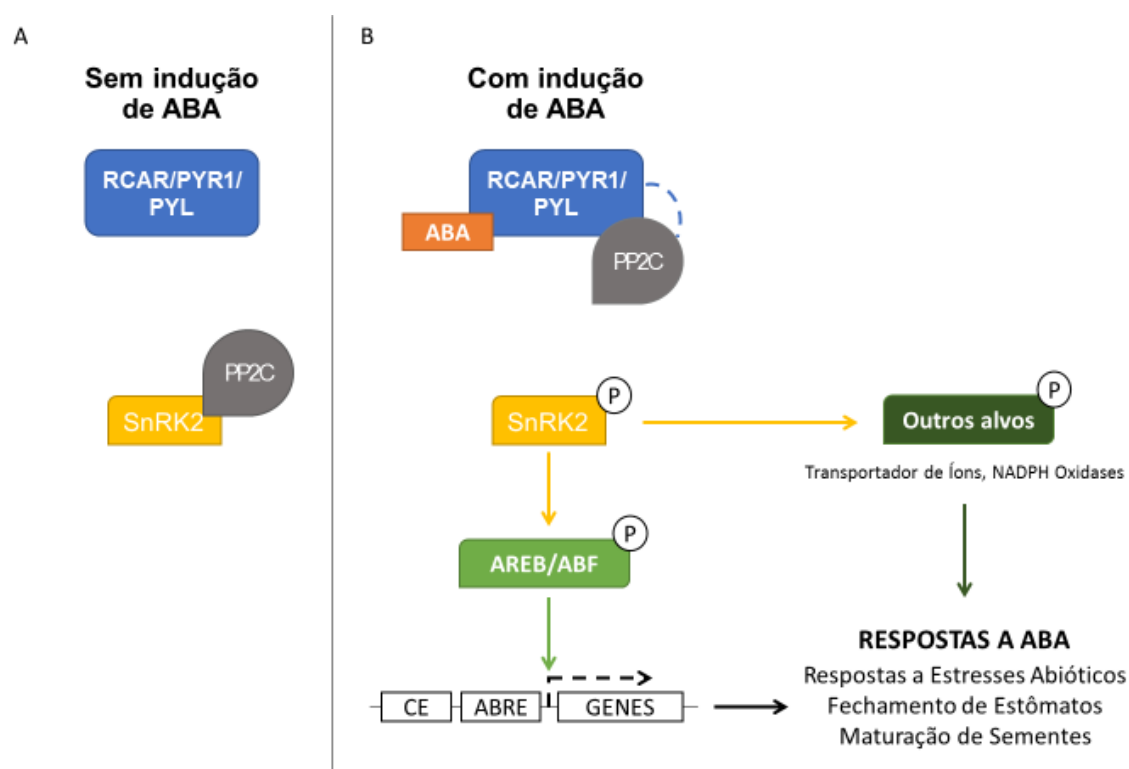
O TF AREB/ABF é ativado após a detecção do estresse pela planta e ao consequente aumento na concentração de ABA, por um sistema de regulação duplo-negativo. O ABA se liga aos receptores de ABA RCARs/PYR1/PYLs (*Regulatory Components of ABA Receptor/Pyrabactin Resistance Protein1/PYR-Like proteins*) para formar o complexo que fornece um sítio ativo para a ligação da PP2C (Proteína Fosfatase do tipo 2C), causando assim, a inibição da atividade da PP2C. Essa

inibição da PP2C possibilita a indução da proteína quinase SnRK2, a qual sofre auto fosforilação. Uma vez ativadas, as SnRK2s atuam como regulador positivo da sinalização, fosforilando seus alvos a jusante, como os fatores de transcrição AREB/ABF, que se ligam ao *cis* elementos ABRE e modulam a expressão gênica (MA *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2009; DE ZELICOURT, 2016).

Assim, na presença de ABA, os PP2Cs são inativados, e não podem reprimir a atividade da fosfatase SnRK, a qual uma vez estando livre, poderá iniciar a via de regulação responsiva a ABA, e ativar através da fosforilação, o elemento responsivo a ABA (ABRE) que regula a expressão de muitos genes (Figura 2.1B). Quando não ocorre o estresse, a sinalização por ABA é inativada, pois não há inibição da PP2C, e esta permanece ligada a SnRK2 impedindo sua fosforilação (YOSHIDA *et al.*, 2010; SOON *et al.*, 2012). (Figura 2.1A).

Vários TFs regulam a expressão de genes que respondem a ABA através de ABRE, que contém a sequência central PyACGTGGC, que regula a expressão gênica responsiva à desidratação e à alta salinidade em plantas na via dependente de ABA. (ZANDKARIMI *et al.*, 2015). No entanto, para que ocorra todo mecanismo de transcrição de genes ABA-dependentes através de AREB, uma única cópia de ABRE não se mostra suficiente. Um par de elementos ABRE ou Elementos de Acomplamento (CE) são necessários para realizar a transcrição (GÓMEZ-PORRAS *et al.*, 2007). Três elementos de acoplamento foram descritos, CE1, CE3 e DRE (elemento que responde à desidratação), sendo esses CE semelhantes a ABRE, mas como indicado acima, um par ABRE também pode funcionar como um Complexo Responsivo Mínimo a ABA (ABRC), com o segundo ABRE desempenhando o papel de um CE (SHEN; ZHANG; HO, 1996). Todos esses componentes serão responsáveis pelo desencadeamento das respostas do complexo ABA (Figura 2.1B).

Figura 2.1 – Rota de sinalização do ácido abscísico principal (ABA). (A) Na ausência de ABA, os receptores ABA são inativados e as Proteínas Fosfatase 2C (PP2C) inibem as ações relacionados com as Proteínas Quinases tipo 2 (SnRK2). (B) Na presença de ABA, os receptores ABA, que são proteínas do complexo RCAR/PYR1/PYL que se ligam a ABA e por sua vez inibem a atividade da PP2C, permitindo a ativação de SnRK2s através da auto fosforilação. As SnRK2s ativadas então fosforilam seus alvos a jusante, como os fatores de transcrição AREB/ABF, que se ligam ao cis elementos ABRE e modulam a expressão gênica. Eles também podem fosforilar outras proteínas, como transportadores de íons (canais iônicos) e NADPH oxidases. Juntos, esses eventos levam ao estabelecimento da resposta ABA.



Fonte: Adaptado de de Zelicourt *et al.* (2016).

Estudos anteriores mostraram que dos nove membros de AREB/ABFs em *Arabidopsis thaliana*, AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 e ABF3 foram induzidos por ABA e estresse osmótico em tecidos vegetativos (CHOI *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2010; FUJITA *et al.*, 2011), o que sugere que eles estão envolvidos com a sinalização por ABA e/ou a sinalização por estresse. No trabalho de Fujita *et al.* (2005), foi relatado que plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando a forma ativa de *AREB1* mostraram hipersensibilidade ao ABA e maior tolerância à seca.

A hipótese de que o gene *AREB1* está envolvido na ativação de genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular, e são expressos em resposta a estresses abióticos como seca, temperaturas altas e baixas e salinidade (SEKI *et al.*, 2003), foi comprovada em outras espécies. No estudo conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja por Barbosa *et al.* (2012) utilizando plantas de soja superexpressando o gene *AtAREB1*, as plantas transformadas sobreviveram a um período de seca de cinco dias e não apresentaram danos nas folhas, além de, conferir maior crescimento e desempenho fisiológico superior sob seca quando comparado ao tipo selvagem. No trabalho realizado por Marinho *et al.* (2015), utilizando a construção 35S-*AtAREB1*, relatou-se uma sobrevivência de 60% das plantas do evento 1Ea2939 (evento transgênico), enquanto a cultivar convencional BR16 apresentou uma taxa de 0% de sobrevivência, em um experimento de 17 dias de déficit hídrico seguido por 7 dias de reidratação para observar a sobrevivência das plantas.

Embora o gene *AtAREB1* tenha sido prospectado e validado para condições de estresse osmótico e seca, há possibilidade de que o mesmo desempenhe papel de importância mediante outros tipos de estresse, em atribuição à sua função na ativação de um grande número de genes de defesa e proteção celular.

2.5 SINALIZAÇÃO CRUZADA (*CROSS-TALK*) ENTRE OS ESTRESSES POR ENCHARCAMENTO E SECA

O termo sinalização cruzada "*cross talk*" é usado para se referir a situações em que diferentes vias de sinalização compartilham um ou mais intermediários/ componentes ou possuam algum resultado em comum (CHINNUSAMY; SCHUMAKER; ZHU, 2004). As vias de respostas aos estresses abióticos, que aparentam ser vias de sinalizações independentes, podem vir a interagir por meio da sinalização cruzada (KNIGHT; KNIGHT, 2001).

Na literatura vários genes foram relatados como responsivos a diferentes estresses abióticos, podendo apresentar resultados positivos no aumento da tolerância da planta ou até mesmo a geração de um produto intermediário ou final

em comum. Um estudo com o propósito de entender melhor os genes que atuam em vias de resposta por sinalização cruzada foi conduzido por Li *et al.* (2017), que identificou uma série de TFs como RLKs, MAPKs, AP2/ERFBPs, WRKYs, MYBs, enzimas E2 e E3 ligases, como responsivos aos estresses por frio e seca. Em outro trabalho conduzido por Zhu *et al.* (2013) identificou-se 62 genes comuns aos estresse por frio, seca, salinidade e pH, os quais também são induzidos por ABA, podendo estar atuando em uma via de sinalização cruzada em resposta aos diferentes estresses.

No caso da seca e do encharcamento, ambos são estresses recorrentes na natureza, e que causam um impacto negativo em todos os estágios de desenvolvimento, afetando o crescimento e a produtividade da soja (VALLIYODAN; NGUYEN, 2006; KOMATSU *et al.*, 2009). Assim, compreender possíveis mecanismos de sinalização cruzada entre esses estresses auxiliaria no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a ambas condições adversas.

Nesse sentido, vários esforços têm sido feitos para elucidar esses mecanismos. Por exemplo, no estudo de Chen *et al.* (2016) é relatado o *cross-talk* entre algumas famílias de TFs ABA-dependente que são responsivas tanto para o estresse por encharcamento quanto para seca na soja, sendo essas família: AP2, bZIP, MYB e NAC. Na pesquisa de Syed *et al.* (2015) a expressão dos genes *SUB1*, *PRR7*, *TOC1* foram equivalente em ambos os estresses. Apesar desses avanços, os mecanismos de tolerância ao encharcamento em plantas ainda estão longe de serem compreendidos.

Além disso, um dos primeiros componentes identificados em vias de resposta ao estresse são as respostas dos hormônios. Os hormônios constroem uma rede de sinalização e regulam mutuamente vários sistemas metabólicos e de sinalização, que são essenciais tanto para o desenvolvimento das plantas quanto para as respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos (MUNNÉ-BOSCH; MÜLLER, 2013).

Um hormônio bastante estudado para sinalização aos estresses abióticos é o ácido abscísico (ABA). A concentração desse hormônio é regulada positivamente sob condições de seca (XIONG; ZHU, 2002). O aumento do nível de ABA em

condições de deficiência de oxigênio na fase de recuperação pós-estresse foi relatado em *A. thaliana* (YEUNG *et al.*, 2018), porém a regulação de ABA durante o encharcamento e hipóxia permanece vaga (HSU *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2016).

2.6 HIPÓTESES DO ESTUDO

Através de estudos como de Yeung *et al.* (2018), pode-se sugerir uma possível interação entre as vias de respostas aos estresses hídricos pela regulação de níveis de ABA. Sendo assim, podemos lançar a hipótese de que genes como o TF *AREB*, podem vir a promover tolerância na planta tanto a seca quanto ao encharcamento, auxiliando na compreensão dos mecanismos complexos de percepção, sinalização e resposta a diferentes estresses abióticos na soja.

Já para o gene *nsHb-1*, pode vir a ser utilizado na obtenção de plantas mais tolerantes ao encharcamento, devido a sua atividade na manutenção do estado *redox* da célula e regeneração de NAD^+ durante estresses por deficiência de oxigênio (DORDAS *et al.*, 2003; IGAMBERDIEV; HILL, 2004; MOTJ, 2014), sendo assim, é possível que ocorra a ativação desse gene na soja em situação de encharcamento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar os genes *AtAREB1* e hemoglobina não simbiote de classe 1 (*nsHb-1*) em soja sob condição de seca e encharcamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas de soja GM contendo a construção 35S-*AtAREB1* e sua isolinha convencional BR16, nas condições de seca e encharcamento.

Identificar genes da hemoglobina não simbiote (*nsHB*) de soja e caracterizar a sua expressão por meio de PCR quantitativo em raízes e folhas de soja sob seca e encharcamento.

4. ARTIGO A: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PLANTAS DE SOJA GM COM A CONSTRUÇÃO 35S-*AtAREB1* SOB ESTRESSE POR ENCHARCAMENTO E SECA.

4.1 RESUMO

Fatores abióticos, principalmente a seca e o encharcamento, são responsáveis por uma considerável perda na produção de grãos no Brasil e no mundo. A soja, principal oleaginosa cultivada no mundo, é sensível a ambos os estresses. Tanto os mecanismos de tolerância a seca quanto ao encharcamento são rotas complexas e reguladas por uma ampla gama de genes. Vias de sinalização cruzada, em que um mesmo gene responde a diferentes estresses têm sido relatadas na literatura. Estudos prévios confirmam que a superexpressão do gene *AtAREB1* é capaz de conferir tolerância a seca em soja, porém, essas plantas ainda não foram testadas para outros estresses abióticos. Com essa premissa, objetivou-se nesse estudo, caracterizar fisiologicamente e molecularmente plantas de soja GM superexpressando o gene *AtAREB1*, sob condições de encharcamento e seca, comparando ao seu *background*, a cultivar BR16. Foram realizadas medidas de trocas gasosas, teor de clorofila, quantificação de proteína, peróxido de hidrogênio, e a atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, avaliou-se por meio de PCR em tempo real a expressão de genes comumente ativados sob os estresses por seca e encharcamento. No encharcamento, a linhagem GM 1Ea2939 foi eficiente em manter maiores taxas para fotossíntese, eficiência intrínseca no uso de água e eficiência instantânea de carboxilação e apresentou um maior desenvolvimento no estágio reprodutivo, após a exposição ao estresse durante o estágio vegetativo, em comparação a cultivar BR16. A linhagem GM também apresentou maior teor de proteína e menor concentração de peróxido de hidrogênio, o que pode estar associado a um mecanismo de regulação mais eficiente dos níveis de ROS. Nas plantas transgênicas observou-se também uma menor ativação de genes do metabolismo fermentativo e da produção de alanina, sugerindo sua maior adaptabilidade ao estresse. Esses resultados indicam que, além da tolerância a

seca, as plantas superexpressando o gene *AtAREB1* apresentaram melhor desempenho sob condições de encharcamento, em comparação ao seu *background* convencional.

4.2 INTRODUÇÃO

Culturas produtoras de grãos, como a soja, estão expostas a ambientes adversos que podem limitar seu crescimento e desenvolvimento (KULCHESKI, 2013). Mundialmente, fatores bióticos e abióticos comprometem a produtividade de várias culturas de grãos com conseqüente queda na produtividade (NOWICKA *et al.*, 2018).

Ao mesmo tempo em que a demanda por alimentos está se intensificando, o clima está mudando, com conseqüências inevitáveis para a agricultura e para o suprimento mundial de alimentos, de modo que, em algumas regiões poderão ocorrer períodos severos de seca, enquanto em outras, o aumento da frequência de chuvas intensas favorece o encharcamento do solo ou até mesmo a inundação (FISHER; SCOTFORD; BARRITT, 2017).

O estresse por deficiência hídrica é um dos principais fatores responsáveis pela instabilidade na produção de grãos ao longo dos anos (SHARMA *et al.*, 2018). A cultura da soja é sensível a seca, particularmente no que se refere as fases de germinação-emergência (FARIAS *et al.*, 2001) e enchimento dos grãos (DOSS *et al.*, 1974; SIONIT; KRAMER, 1977), resultando em perdas de até 40% em sua produção (MARCOS-FILHO, 2015; LIANG, 2016). Na planta o estresse causado por deficiência de água determina a ocorrência de plantas de soja pouco desenvolvidas, com pequena estatura, área foliar reduzida e entrenós curtos (FERRARI; PAZ; SILVA, 2015). Além disso, a falta de água reduz ou impossibilita o processo fotossintético, devido ao fechamento dos estômatos para que a planta não sofra com a desidratação (LAWLOR, 2002). Por esse motivo se aferiu medidas de trocas gasosas e de massa seca, bem como o crescimento da planta após a aplicação ao estresse, visto que esses parâmetros são significativamente afetados em plantas mais sensíveis aos estresse.

Já o encharcamento é um estresse relativamente comum em áreas de cultivo de grãos, onde a drenagem não ocorre de forma eficiente pelo solo, tendo efeito severo sobre o crescimento e rendimento nas plantas cultivadas. A principal consequência do encharcamento do solo é a redução na disponibilidade de oxigênio para as raízes, o que acarreta uma deficiência na produção de ATP, pela inibição do ciclo de Krebs e conseqüentemente, da cadeia transportadora de elétrons (FUKAO; BAILEY-SERRES, 2004; ROCHA *et al.*, 2010), além de aumentar a produção de ROS (GECHEV; HILLE, 2005; NEIL *et al.*, 2002; QUAN *et al.*, 2008; UCHIDA *et al.*, 2002). Logo, foram quantificados o conteúdo de proteínas solúveis, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a atividade de enzimas antioxidantes para verificar se a inserção do transgêne alterou no conteúdo proteico das células, podendo auxiliar na maior tolerância ao estresse, e também foram quantificadas ROS e enzimas de atividade antioxidante para indicar se a planta está em balanço *redox* através da produção balanceada de proteínas. Esse estresse é frequente em regiões de solos hidromórficos (MISSIO *et al.*, 2010), devido sua deficiente drenagem natural. Entre as quatro grandes culturas - soja, trigo, milho e arroz - apenas plantas de arroz são adaptadas ao encharcamento do solo, e todas são sensíveis à submersão total (BAILEY-SERRES; LEE; BRINTON, 2012). Para a cultura da soja, o encharcamento causa prejuízos, como menor viabilidade de sementes, morte de plantas no campo, além de favorecer uma maior incidência de doenças (THEISEN *et al.*, 2009).

Entre as estratégias para mitigar o efeito dos estresses abióticos na cultura da soja, está o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes. Ferramentas biotecnológicas como a transgenia têm sido amplamente testadas visando a obtenção dessas características (KUMAR *et al.*, 2018). Entretanto, é preciso considerar a complexidade dos mecanismos de respostas de plantas frente às condições de estresses abióticos. Sendo assim, é necessário buscar genes que promovam a ativação de respostas múltiplas na planta frente o estresse hídrico.

Na literatura inúmeros trabalhos foram bem sucedidos em obter plantas mais tolerantes a estresses abióticos por meio da superexpressão de fatores de transcrição (TFs). Alguns exemplos são as proteínas de ligação a elementos

responsivos a desidratação (DREB1 e DREB2) em *Arabidopsis thaliana* (LIU *et al.*, 1998), bem como, os genes *AREB* (Elementos de ligação responsivo ao ácido abscísico) em *Arabidopsis* (KIM *et al.*, 2004; FUJITA *et al.*, 2005), soja (BARBOSA *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2014), tomate (ORELLANA *et al.*, 2010), entre outras culturas, os quais melhoraram o desempenho das plantas frente ao estresse por seca.

Para o encharcamento, a maioria dos estudos têm como foco a cultura do arroz, onde genes SUBMERGENCE-1 (*SUB1A*) (XU *et al.*, 2006) e SNORKEL (*SNK1* e *SNK2*) (HATTORI *et al.*, 2009), da família ERF (*Ethylene Response Factors* - Fator de resposta ao etileno), destacam-se pela capacidade de conferir tolerância a submersão. Entretanto, ortólogos desses genes (*SUB1* e *SNK*) não foram identificados em *Arabidopsis* e em soja.

Em *Arabidopsis*, outros genes da família ERF como o *HRE1* (*Hypoxia Responsive ERF gene 1*) e *HRE2* (*Hypoxia Responsive ERF gene 2*) (LICAUSI *et al.*, 2010; NAKANO *et al.*, 2006) e *RAP2.2* (HINZ *et al.*, 2010), ou ainda da família NAC, como o gene *SHYG* (*Speedy Hyponastic Growth* - rápido crescimento hiponástico) (HOFMANN, 2013), demonstraram ter um papel importante na sobrevivência de plantas sob hipóxia. Por outro lado, em soja, a informação gerada acerca dos genes identificados e caracterizados nas respostas ao encharcamento está longe de ser suficiente para o entendimento dos mecanismos de tolerância.

No ambiente, as plantas estão expostas a diferentes estresses, os quais podem até ocorrer de forma simultânea, fazendo com que a planta module respostas adaptativas através de vias de sinalização complexas que se sobrepõem e integram em diversos níveis (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2010). As vias de respostas aos estresses abióticos que aparentam ser vias de sinalizações independentes, podem vir a interagir por meio da sinalização cruzada (KNIGHT; KNIGHT, 2001). A sinalização cruzada é de significativo interesse para a seleção de genes candidatos que possam conferir maior tolerância a múltiplos estresses. Para isso, foram realizada a quantificação de genes induzidos pelos estresses de seca e encharcamento para verificar se a inserção do transgene alterou a expressão de

genes para resposta e obtenção de plantas mais tolerantes à ambos os estresses hídricos.

Entre as diferentes vias de sinalização de resposta a estresses abióticos, a maioria envolve os TFs, os quais pertencem a famílias diversificadas, representando aproximadamente 10% dos genes da soja, e que estão envolvidos na maioria das respostas da planta a estresses (CHEN *et al.*, 2016). Os TFs ativam a expressão de genes envolvidos na proteção das estruturas celulares e/ou na alteração/manutenção de atividades de enzimas importantes no metabolismo celular, podendo agir em resposta a múltiplos estresses. No estudo recente de Zhang *et al.* (2018), foi demonstrado que 75,6% dos TFs da família bZIP identificados em soja foram diferencialmente expressos tanto na seca quanto no encharcamento.

Entre os TFs da família bZIP estão os genes *AREB/ABF* de *Arabidopsis*, que conferem tolerância a estresses abióticos em plantas (CHOI *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2010). Três membros dessa família, conhecidos como AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 e ABF3 estão envolvidos nas respostas a seca (CHOI *et al.*, 2000; UNO *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004; FUJITA *et al.*, 2005; FURIHATA *et al.*, 2006), estresse osmótico (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006; FUJITA *et al.*, 2013; YOSHIDA *et al.*, 2010) e frio (CHOI *et al.*, 2000; FUJITA *et al.*, 2011). Sob hipóxia, dois genes *AREB/ABF* (Glyma.06G040400 e Glyma.19G122800) foram descritos por Nakayama *et al.* (2017) por serem induzidos após 28 horas de hipóxia.

Em soja, no estudo conduzido por Barbosa *et al.* (2012), plantas de soja superexpressando o TF *AtAREB1* apresentaram desempenho fisiológico superior sob seca quando comparado ao *background* não transformado. No trabalho realizado por Marinho *et al.* (2015), utilizando a construção 35S-*AtAREB1*, relatou-se maior sobrevivência de plantas de soja GM após seca severa seguida da reidratação. Esse comportamento foi confirmado também em condições de campo em estudo conduzido por Fuganti-Pagliarini *et al.* (2017). Entretanto, a caracterização dessas plantas transformadas mediante o encharcamento ainda não foi realizada.

Partindo do pressuposto da existência da sinalização cruzada entre genes que atuam nos mecanismos de resposta a seca e ao encharcamento, esse estudo teve por objetivo caracterizar fisiológica, bioquímica e molecularmente, plantas de soja geneticamente modificadas com a construção 35S-*AtAREB1*, sob os estresses por seca e encharcamento.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Obtenção do Material Vegetal

O experimento foi estabelecido com dois genótipos de soja, sendo uma linhagem geneticamente modificada (GM) para a tolerância a seca (1Ea2939), a qual possui a construção 35S-*AtAREB1*, e uma cultivar convencional (BR16), que constitui o seu *background* genético utilizado na transformação. A linhagem transgênica foi previamente obtida por transformação via *Agrobacterium* da cultivar convencional BR16, no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, e caracterizada no estresse por seca por Marinho *et al.* (2015). A mesma encontra-se em homozigose na geração (F8). A escolha do evento 1Ea2939 deve-se ao fato deste estar em única cópia do transgene, além de ter apresentado desempenho superior sob condições de seca, com uma maior ativação dos genes de resposta ao estresse (MARINHO *et al.*, 2015; FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017).

As sementes utilizadas no experimento foram pré-germinadas em rolos de papel Germitest® umedecidos com volume de água equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco e incubadas por 96 horas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 100% de umidade relativa, conforme a Regra para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Transcorrido esse período, realizou-se a transferência de duas plântulas de tamanho semelhante e com desenvolvimento normal para vasos (15 cm diâmetro externo x 10 cm base x 11 cm altura) preenchidos com 1,1 kg de substrato, sendo o substrato composto por areia e solo na proporção 1:1. Inicialmente foram colocadas duas plântulas por vaso, adicionando inoculante Nitragin Cell Tech HC® (Novozymes, Franklinton, North

Carolina, EUA). Os vasos foram dispostos em casa de vegetação ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$), e após a completa emergência e estabelecimento das plantas, realizou-se o desbaste, mantendo uma planta por vaso.

O experimento foi conduzido em condição de irrigação diária (próximo da capacidade de campo), até atingirem o estágio V3 (FEHR; CAVINESS, 1977). Nesse momento, as plantas foram irrigadas até a saturação do solo, e a partir desse período, foi iniciado o estresse, tanto por seca quanto por encharcamento. No tratamento de seca, o estresse foi aplicado por meio da suspensão da irrigação, seguindo a metodologia proposta por Ferreira *et al.* (2014) e Marinho *et al.* (2015). No tratamento de encharcamento, os vasos foram colocados dentro de recipientes maiores, os quais foram alagados até a formação de uma lâmina com altura de 5 cm acima da superfície do solo. No tratamento controle, as plantas permaneceram com irrigação diária. Os tratamentos (seca, encharcamento e controle) foram aplicados durante um período de sete dias.

Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso em um esquema fatorial 2 x 3 (2 genótipos, 3 disponibilidades hídricas), contendo 6 repetições.

O estresse foi aplicado e a condutância estomática foi monitorada, por meio do analisador portátil (LI-6400XT, LI-COR), até que se obtivesse o valor de $0,02 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o qual foi pré-estabelecido como um indicador de estresse (FLEXAS *et al.*, 2006). Esse valor foi obtido no sétimo dia após o início do estresse. Nesse momento, foram realizadas as avaliações fisiológicas e a coleta de amostras de tecido de folha e de raiz para as avaliações bioquímicas e moleculares.

4.3.2 Coleta de Dados

4.3.2.1 Análises fisiológicas

Anteriormente à coleta das amostras, foram realizadas as medidas da taxa fotossintética (A), concentração interna de CO_2 (C_i), condutância estomática (Gs) e transpiração (E). As leituras foram efetuadas no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido sentido ápice-base por meio analisador portátil (LI-

6400XT, LI-COR), com uma fonte de luz 90% vermelha + 10% azul e câmara de 2 cm². As medições foram realizadas no interior da casa de vegetação entre 9 e 11h e em boas condições de luminosidade, considerando-se as seguintes condições: radiação fotossinteticamente ativa (PAR), 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; referência de CO₂, 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; referência de água, 18-20 mmol mol⁻¹; fluxo de CO₂, 400 $\mu\text{mol s}^{-1}$. As medidas do teor de clorofila foram realizadas no último dia de experimento no período da manhã, utilizando o aparelho SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development).

O teor de clorofila foi estimado pela equação, conforme metodologia de Rodrigues *et al.* (2012):

$$\text{Teor de Clorofila} = (\text{Valor do SPAD} \times 0,0007) - 0,0071.$$

Utilizando os valores obtidos de fotossíntese (A), concentração interna de CO₂ (C_i), condutância estomática (G_s) e transpiração (E) foram calculadas a eficiência instantânea no uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EIC) e eficiência intrínseca no uso da água (EiUA) utilizando as seguintes fórmulas (DA SILVA *et al.*, 2013):

$$EUA = \frac{A}{E} \quad EIC = \frac{A}{C_i} \quad EiUA = \frac{A}{G_s}$$

Um segundo experimento foi instalado seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. O delineamento foi um fatorial 2 x 3 x 16 (2 genótipos, 3 disponibilidades hídricas e 16 repetições). As plantas foram cultivadas em condição ideal até o estágio V3 (FEHR; CAVINESS, 1977) quando deu-se início estresse pelo período de sete dias, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

Após esse período realizou-se a coleta de cinco plantas de cada condição para determinação da massa seca da folha em conjunto com o pecíolo, caule e raiz, enquanto que as demais permaneceram para avaliação do rendimento. A massa seca foi realizada em estufa a 60°C graus por 48 horas e pesadas em balança de precisão. Além disso, foram coletados os valores de altura no sétimo dia de estresse e nas plantas que permaneceram na casa de vegetação, sendo mensurada a altura no estágio reprodutivo.

4.3.3 Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas e moleculares, foram coletados tecidos de folhas e de raízes, em três repetições biológicas, sendo cada repetição constituída por amostras de duas plantas. Os tecidos foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido, para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6), proteínas totais solúveis e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Para as quantificações de SOD, CAT e proteínas totais solúveis, foi feito um extrato aliquotando aproximadamente 200 mg de tecido macerado e utilizou-se o protocolo de Gratão, Carvalho e Monteiro (2014) com adaptações. Todas as análises foram realizadas com três repetições biológicas e três replicatas técnicas.

A atividade da SOD foi determinada com triplicatas do 0,1 mL de extrato utilizando o protocolo de Broetto (2014) com pequenas modificações. A amostra foi analisada em espectrofotômetro a 560 nm de absorvância. O branco foi obtido sem sua exposição a luz e um controle foi feito sem o extrato enzimático. Uma unidade de SOD (U SOD) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (azul de nitrotetrazólio). Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína⁻¹.

A atividade da CAT foi determinada conforme protocolo de Azevedo *et al.* (1998) com alterações, utilizando 0,15 mL de extrato em triplicata. O processo foi realizado com o mínimo de iluminação, utilizando tubos envoltos por alumínio. A atividade foi determinada pelo monitoramento da degradação de H₂O₂ no período de 1 minuto, anotando-se os valores da absorvância no tempo zero, logo após inserir a cubeta no espectrofotômetro, e após 1 minuto. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 240 nm de absorvância. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 36M cm⁻¹ (ANDERSON; PRASAD; STEWART, 1995), e os resultados foram expressos em μmol de H₂O₂/mg de proteína⁻¹.

Para a determinação das proteínas totais solúveis foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976) em triplicatas de 0,05 mL do extrato de folha e 0,1 mL

do extrato de raiz, utilizando um espectrofotômetro a 595 nm de absorvância. A curva padrão ao qual foi comparada as amostras do experimento, foi confeccionada utilizando BSA (Albumina de Soro Bovino) com concentrações crescentes a cada 20mg/mL. Os resultados foram expressos em μg de proteína/g de biomassa.

Para a quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizou-se uma reação com base de iodeto de potássio (KI), seguindo protocolos estabelecidos por Alexieva *et al.* (2001) em triplicatas com 0,2 mL de extrato. O branco foi realizado com a mesma solução, porém em substituição dos 0,2 mL de amostragem foi adicionado 0,2 mL de TCA (Ácido tricloroacético). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 390nm de absorvância. As concentrações de H_2O_2 nas amostras foram calculadas com base na curva de calibração, sendo confeccionados dois gráficos, visto que as amostras de folha apresentavam maior conteúdo de H_2O_2 em comparação com as raízes. Foi preparado uma solução padrão para cada curva, uma contendo 0,05 mL de H_2O_2 em 10 mL para as amostras de folha e a outra contendo 0,025 mL de H_2O_2 em 10 mL para as amostras de raiz. Os resultados foram expressos em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ folha⁻¹ e μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ raiz⁻¹.

4.3.4 Quantificação da Expressão de Genes Por PCR em Tempo Real

As amostras de folha e raiz foram maceradas utilizando nitrogênio líquido em um almofariz com o uso de pistilos esterilizados com RNase away (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). O RNA total foi extraído dos tecidos utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas três repetições biológicas, sendo que cada repetição foi constituída de amostras coletadas a partir de duas plantas.

Posteriormente, realizou-se o tratamento das amostras para remoção do DNA contaminante utilizando a enzima DNase I (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A partir do RNA tratado foi sintetizado o cDNA utilizando SuperScript III First Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) seguindo protocolo do fabricante. O cDNA de alta qualidade foi utilizado para analisar os transcritos em cada tratamento.

As amplificações RT-qPCR foram realizadas utilizando o SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em um termociclador 7300 RT-qPCR (Applied Biosystems / Life Technologies, Grand Island, New York, EUA) com os seguintes parâmetros de ciclagem: 50°C por 2 min; 95°C durante 10 min; e 45 ciclos de 95°C durante 2 min, 60°C durante 30 s e 72°C durante 30s. As curvas padrão foram produzidas a partir de diluições seriadas de um *pool* de cDNA para estimar a eficiência da amplificação por PCR com cada par de *primer*. As concentrações dos *primers* foram ajustadas para atingir taxas de eficiência superiores a 90%. Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas.

O desenho dos *primers* foi feito baseado nas sequências de cDNA do banco de dados Phytozome (GOODSTEIN *et al.*, 2012) e com auxílio da ferramenta Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2012), utilizando os parâmetros ideais para o primer para RTq-PCR, sendo o amplicon até no máximo 150pb, a T_m de aproximadamente 60°C, conteúdo de GC de 40-60%, sem complementariedade dentro dos primers.

Para escolha dos genes alvos, além de verificar a expressão do transgene *AtAREB1*, foram avaliados três genes responsivos a seca, *Dehidrina-like* (Glyma.09G185500), *Heat Shock Protein (HSP70)* (Glyma.17G072400) e *Late Embriogenesis Abundant (LEA18)* (Glyma.17G164200) selecionados com base em estudo conduzido por Fuganti-Pagliarini *et al.* (2017) (Tabela 4.1) e três genes responsivos ao encharcamento, *Alanina aminotransferase 1 (GmAlaAT1)* (Glyma.07G045900), *Alanina aminotransferase 2 (GmAlaAT2)* (Glyma.01G026700) e *Álcool desidrogenase (ADH)* (Glyma.04G240800), selecionados com base nos estudos de Nakayama *et al.* (2017). Posteriormente, para compreensão de respostas durante o encharcamento, investigou-se a expressão do gene *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)* (Glyma15g40070), utilizado no trabalho de Rodrigues *et al.* (2015) e *Sucrose synthase (SuSy)* (Glyma13g17420) utilizado no trabalho de Nakayama *et al.* (2017). Os genes endógenos utilizados foram o da β -actina (Glyma.15G050200) e o *FYVE zinc finger* (Glyma.13G114700), que tiveram sua estabilidade confirmada em soja sob os estresses por seca e encharcamento,

por meio de estudos prévios (NAKAYAMA *et al.*, 2014; MARCOLINO-GOMES *et al.*, 2015).

Para o gene *AtAREB1* realizou-se apenas a normalização dos dados pelos genes endógenos, confirmando assim a atuação do promotor 35S nas diferentes condições de disponibilidade hídrica. Para os demais genes alvos, além da normalização, realizou-se a calibração das amostras sob estresse pela condição controle. Os dados foram rodados no software Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

Tabela 4.1 – Design de *Primers* para RTq-PCR. Identificação, sequências de *primers* e eficiência de amplificação. E - Eficiência de amplificação em porcentagem.

| Identificação (ID) | Anotação | Primer Forward | Primer Reverse | E (%) |
|---------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| 35S-A β AREB1 | - | 5'- GGAGGTGGAGGGTTGACTAG-3' | 5'-CACTGCTCTGAAACTCATCAAACG-3' | 99.0 |
| Glyma.09G185500 | <i>Dehidrine-like</i> | 5'-GGTAGACAGCATTCTAGTGG-3' | 5'-TACCATAGACACCGGTAGTT-3' | 90.6 |
| Glyma.17G072400 | <i>Heat Shock Protein - HSP70</i> | 5'-TTTCGGGTTTGAATGTGTTG-3' | 5'-AGGTCAAAGATAAGCACGTT-3' | 90.0 |
| Glyma.07G045900 | <i>Alanina aminotransferase GmAlaAT1</i> | 5'-AGAATATTTTGGCGTCCCTT-3' | 5'-TTTGATAGCCTTTTCGGACA-3' | 90.5 |
| Glyma.01G026700 | <i>Alanina aminotransferase GmAlaAT2</i> | 5'-AGTTGCAGAAATGTGGTTTG-3' | 5'-AGGCAGTAGAAAACATCTGG-3' | 90.3 |
| Glyma.13G114700 | <i>FYVE zinc finger</i> | 5'- TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG-3' | 5'- GATCCCTCATCCATACATTTTCAG-3' | 98.4 |
| Glyma.15G050200 | β -actin | 5'- GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3' | 5'- CGTTTCATGAATTCAGTAGC-3' | 97.9 |
| Glyma.17G164200 | <i>Late embryogenesis abundant/LEA18 Alcohol</i> | 5'- AAAGGCACAGAGTGATGAAT-3' | 5'-CTTGATGACCTTGTGTACCA-3' | 90.0 |
| Glyma.04G240800 | <i>dehydrogenase, class III</i> | 5'-CCTGTGAGGGACTGAGTTCTCTTTC-3' | 5'-ACAGCAGCAAAGGTCCTATCATTCT-3' | 91.0 |
| Glyma15g40070.1 | <i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)</i> | 5'-CCAGAAGCCTTACCTCAAAT-3' | 5'-TCATGGTGGGTTCTTTCAA-3' | 90.0 |
| Glyma13g17420 | <i>Sucrose synthase (SuSy)</i> | 5'-TGTTGTTGCATGATTTGGATCTTG-3' | 5'-CACGGCTTAAAATTGAATTGATGG-3' | 90.0 |

Fonte: Próprio autor.

4.3.5 Estatísticas

Realizou-se a análise estatística por meio do software RStudio (RSTUDIO TEAM, 2015), verificando inicialmente se os resíduos apresentavam normalidade na distribuição através do teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente realizou-se a análise de variância (ANOVA) e quando houve significância, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade. Quando o resultado apresentava interação genótipo/tratamento utilizou-se letra maiúsculas para representar a separação de diferenças entre genótipos dentro do tratamento e letra minúscula para separação de diferenças entre os tratamentos dentro de genótipo. Os gráficos foram feitos através do programa GraphPad Prism 7.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

4.4 RESULTADOS

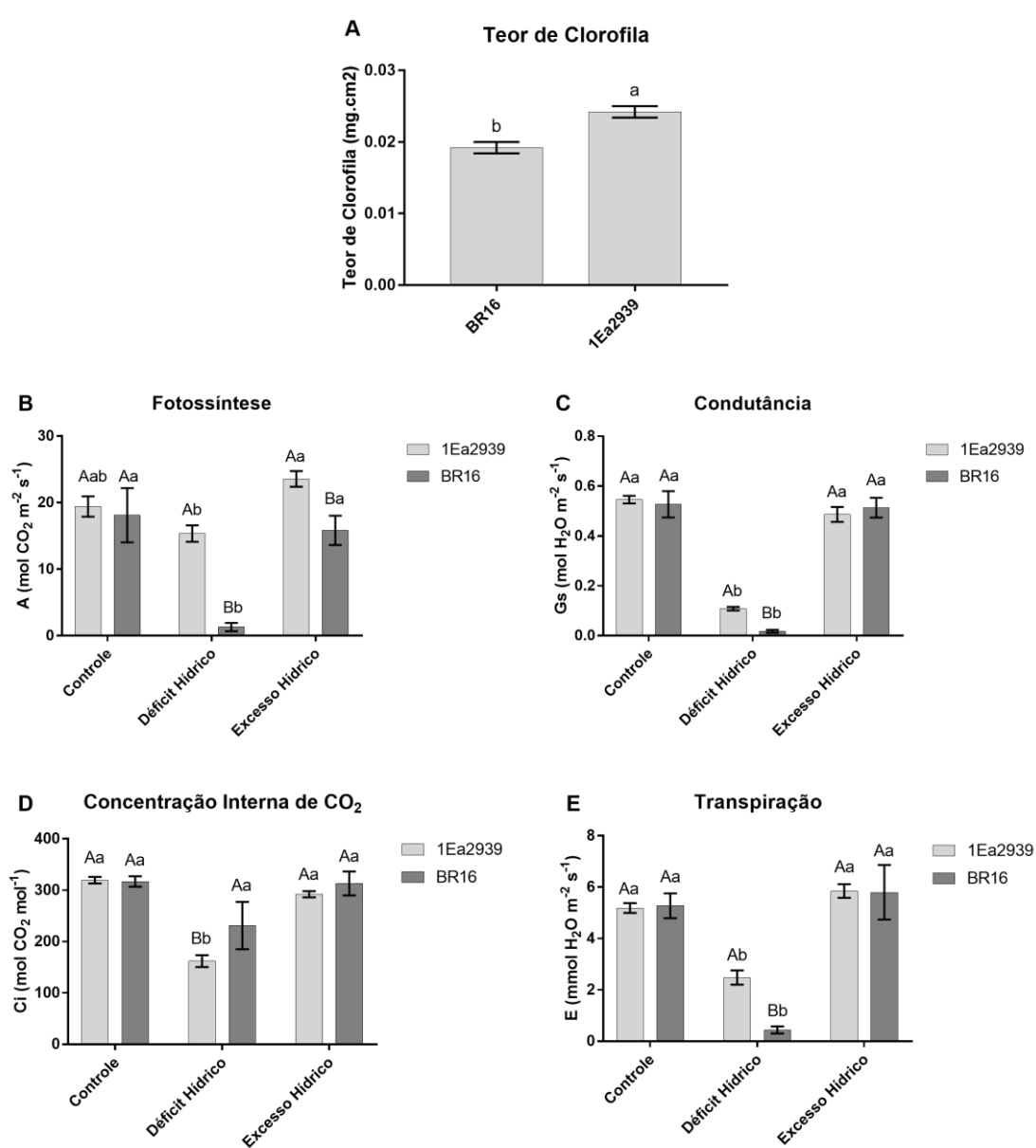
4.4.1 Análises Fisiológicas

Para o teor de clorofila (Figura 4.1A) observou-se apenas efeito de genótipo, sem influência do tratamento, onde a linhagem GM 1Ea2939 apresentou maior teor de clorofila, em comparação a cultivar BR16.

As demais variáveis fisiológicas apresentaram interação significativa genótipo/tratamento. Na fotossíntese (Figura 4.1B) a linhagem GM 1Ea2939 apresentou desempenho superior em comparação a cultivar BR16, nas condições de estresse por seca e encharcamento. Já no controle, não houve diferença entre os genótipos. Para a condutância (Figura 4.1C), os valores foram reduzidos drasticamente na seca, e a diferença entre genótipos foi observada somente nessa condição, onde a linhagem 1Ea2939 apresentou taxas superiores em comparação a sua isolinha. Dessa mesma forma, a concentração interna de CO₂ (C_i) foi reduzida sob seca (Figura 4.3D) com diferenças entre genótipos, porém, nesse caso o maior valor foi atribuído a cultivar BR16. A transpiração seguiu a mesma tendência da

condutância estomática, sendo o menor valor no tratamento de seca e com melhor desempenho para a linhagem 1Ea2939 (Figura 4.1E).

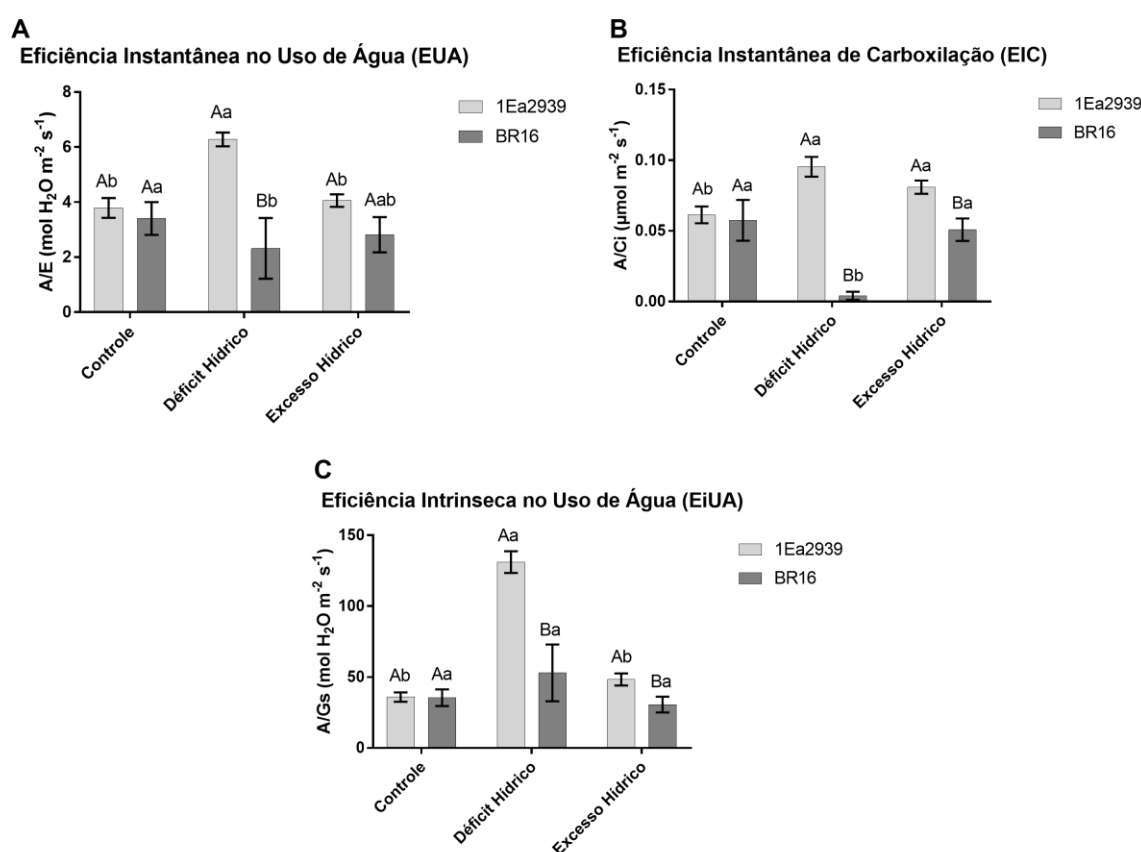
Figura 4.1 – Variáveis fisiológicas para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Teor de clorofila; B) Fotossíntese; C) Condutância; D) Concentração interna de CO₂; E) Transpiração. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo.



Fonte: Próprio autor.

Interações significativas também foram observadas para as variáveis eficiência instantânea no uso da água (EUA) (Figura 4.2A), eficiência instantânea de carboxilação (EIC) (Figura 4.2B) e eficiência intrínseca no uso da água (EiUA) (Figura 4.2C). Sob os estresses por seca e encharcamento, a linhagem 1Ea2939 apresentou desempenho superior em comparação a BR16 para EIC e EiUA. Na seca, o genótipo 1Ea2939 também se destacou em relação a cultivar convencional para a variável EUA.

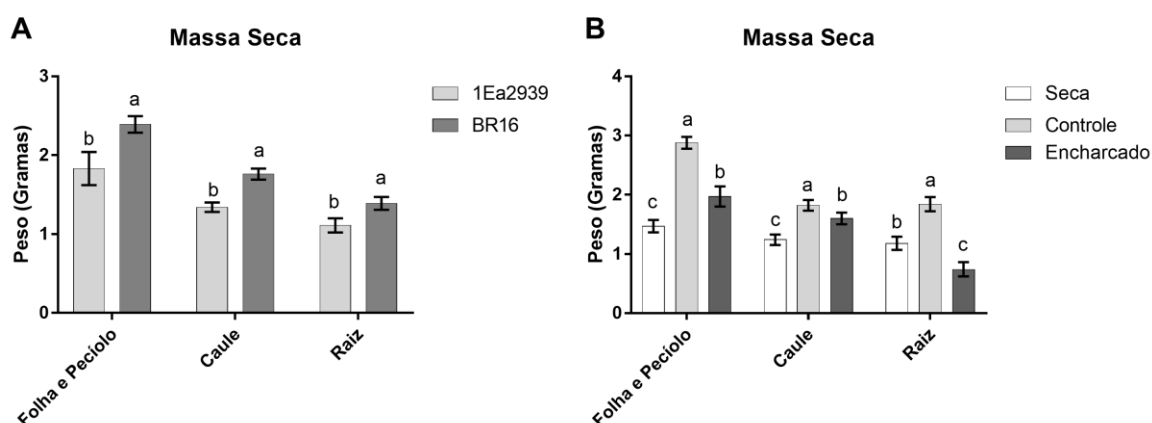
Figura 4.2 – Eficiência no uso da água e carboxilação para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Eficiência instantânea no uso da água; B) Eficiência instantânea de carboxilação; C) Eficiência intrínseca no uso da água. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo.



Fonte: Próprio autor.

Para a massa seca observou-se apenas efeito de genótipo e efeito de tratamento. Independente da condição hídrica, a cultivar BR16 apresentou maiores valores em comparação com a linhagem 1Ea2939 (Figura 4.3A), indicando que a linhagem GM possui um crescimento inicial mais lento em comparação ao *background* não transformado. Em relação aos tratamentos, tanto o estresse por seca como o encharcamento afetaram negativamente o crescimento de plantas em todos os tecidos avaliados (Figura 4.3B). Na raiz, a redução de crescimento ocorreu principalmente sob encharcamento enquanto que nos tecidos de parte aérea, a maior redução foi atribuída a seca.

Figura 4.3 – Massa seca da folha em conjunto com o pecíolo, caule e raiz, para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca, após o estresse no estágio V3. A) Massa seca dos tecidos; B) Massa seca dos tecidos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey (sem interação).

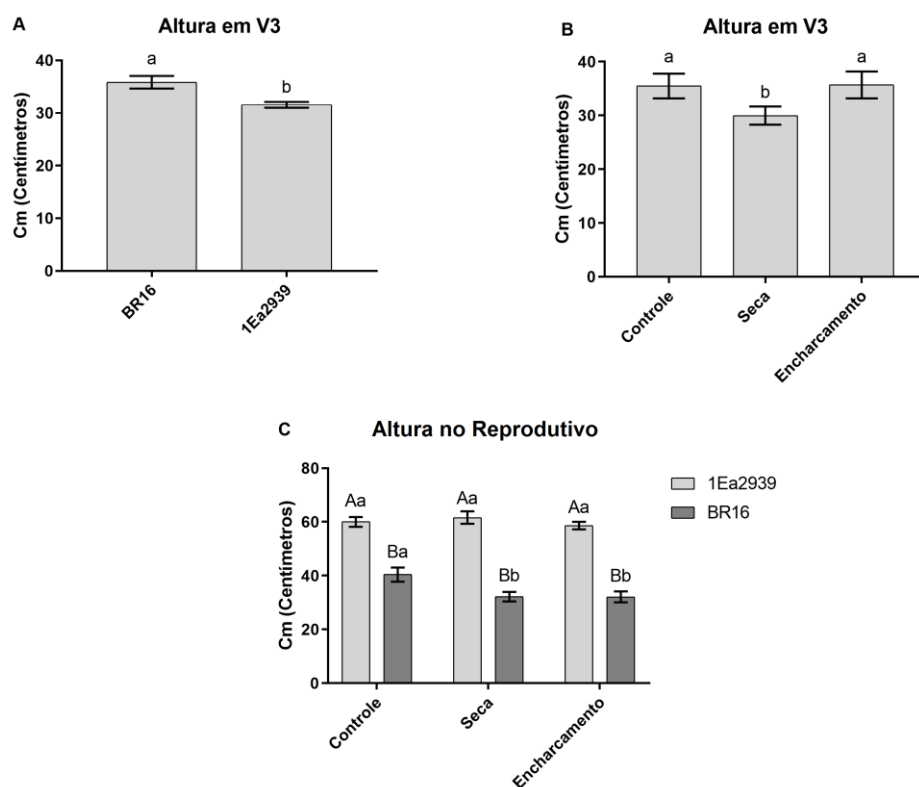


Fonte: Próprio autor.

Para altura de plantas medida no estágio V3, logo após a ocorrência do estresse, apresentou-se efeito simples significativo de genótipo e de tratamento. A linhagem 1Ea2939 apresentou crescimento inicial mais lento em comparação ao *background* não transformado (Figura 4.4A; 4.5). Além disso, a estrutura das plantas foi reduzida em função do estresse por seca (Figura 4.4B).

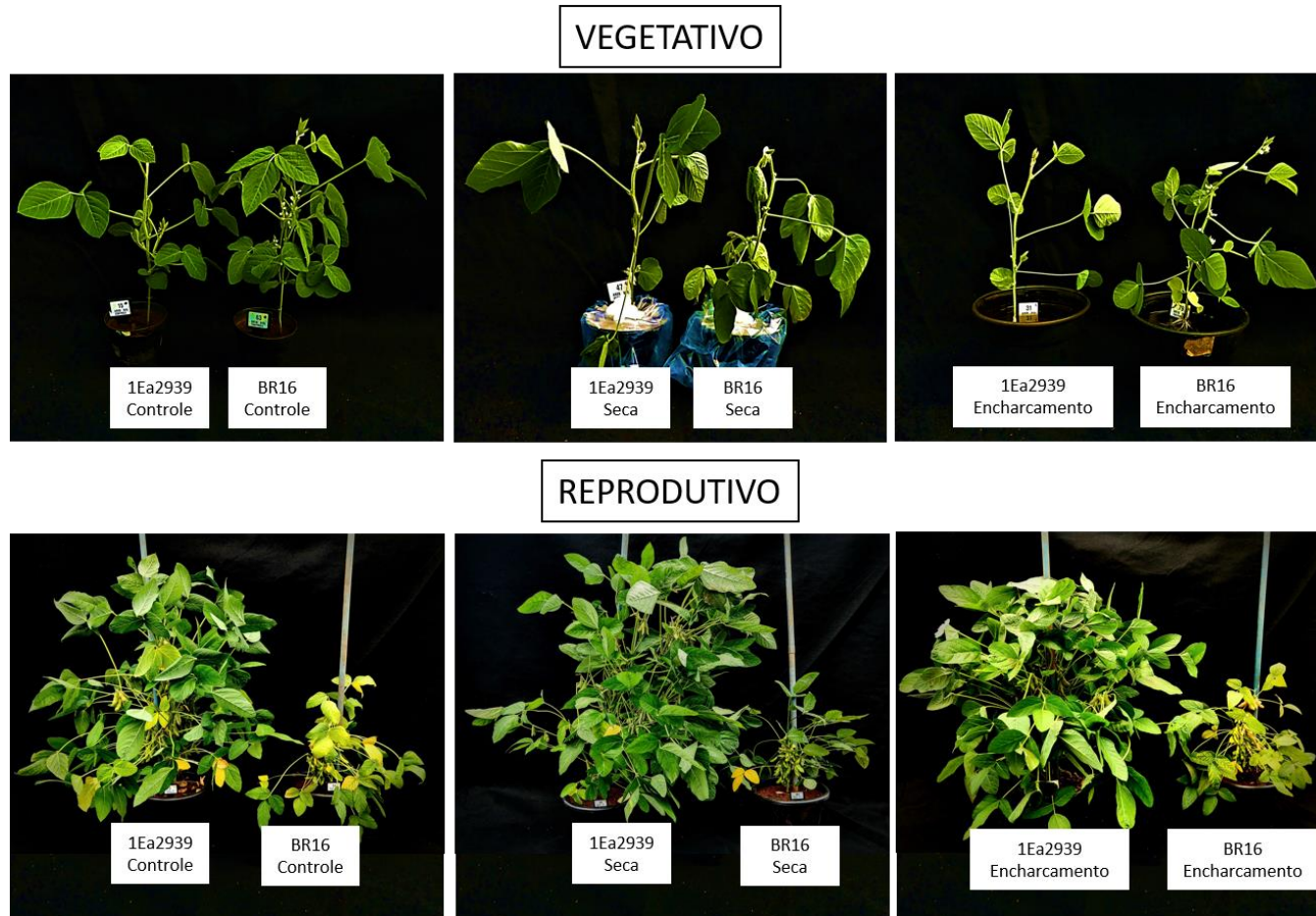
Por outro lado, quando a altura de plantas foi medida no estágio reprodutivo, observa-se uma rápida recuperação das plantas da linhagem 1Ea2939 em comparação a cultivar BR16 (Figura 4.4C; 4.5). Nesse caso, a interação foi significativa, sendo a maior altura de plantas observada na linhagem 1Ea2939, para todas as condições hídricas testadas. Além disso, a linhagem 1Ea2939 não apresentou diferença entre as diferentes condições hídricas, o que demonstra que essa foi capaz de se recuperar após o estresse, enquanto a cultivar BR16 apresentou menor altura na seca e no encharcamento, comparativamente ao controle.

Figura 4.4 – Altura de plantas no estágio V3 no último dia de estresse e no estágio reprodutivo. A) Altura em V3; B) Altura em V3; C) Altura no estágio reprodutivo. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4.5 – Fotos da linhagem 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1) e da cultivar BR16 (*background* convencional) ao final do estresse no estágio V3 e durante o estágio reprodutivo.

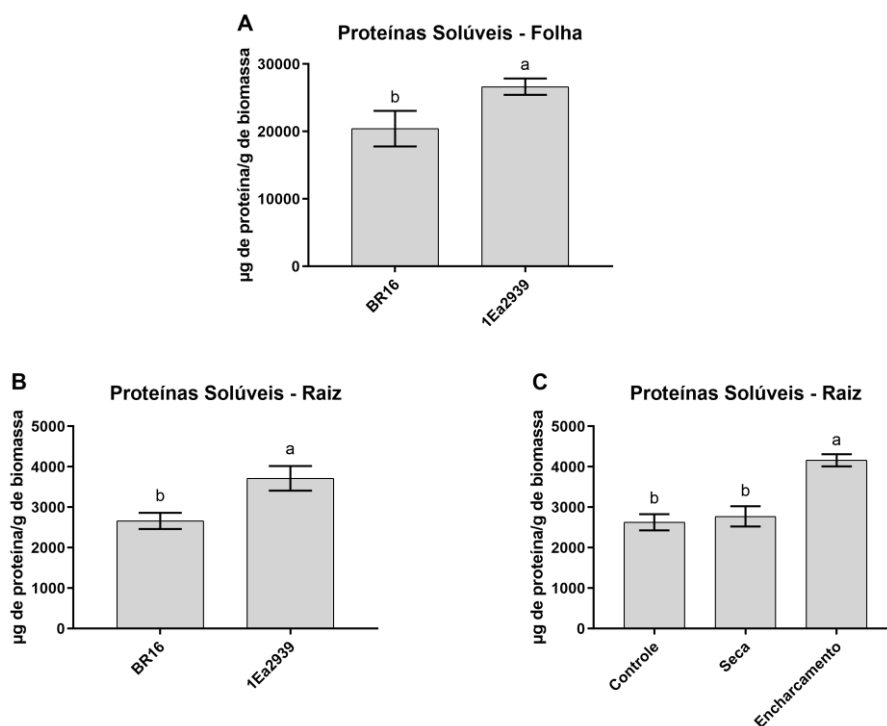


Fonte: Próprio autor.

4.4.2 Análises Bioquímicas

Para as proteínas solúveis, nas folhas houve apenas efeito de genótipo (Figura 4.6A) em que as plantas da linhagem 1Ea2939 apresentaram maior concentração em comparação com a cultivar BR16. Na raiz observou-se efeito de genótipo (Figura 4.6B) e tratamento (Figura 4.6C) porém, sem efeito de interação. Entre os genótipos, novamente a linhagem 1Ea2939 se destacou pela maior concentração de proteína. Em relação aos tratamentos, o maior valor foi atribuído ao encharcamento.

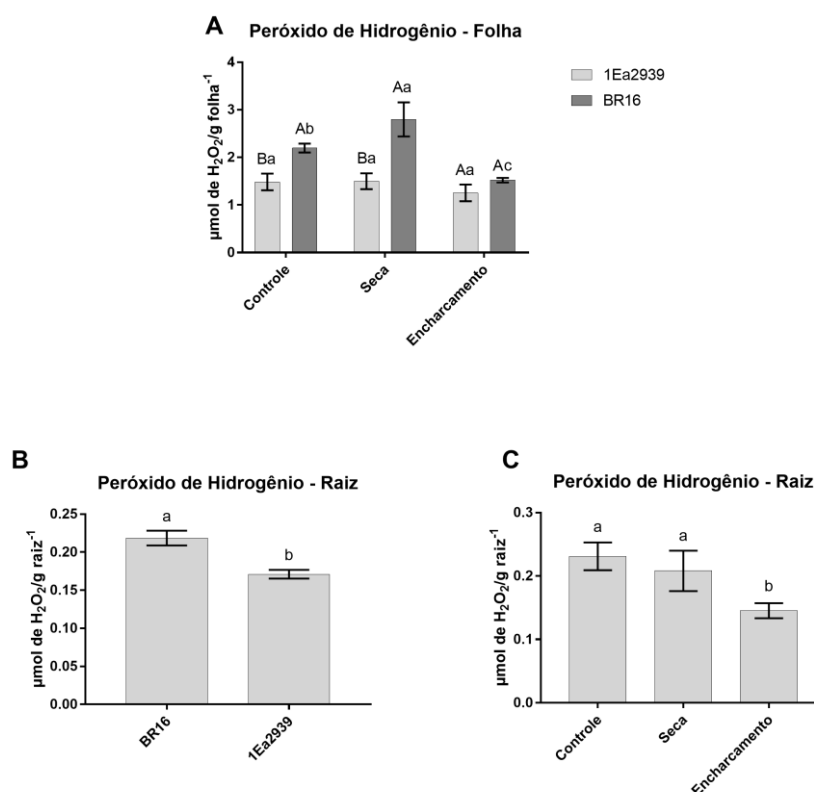
Figura 4.6 – Conteúdo de proteínas solúveis nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de folha para os genótipos; B) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de raiz para os genótipos; C) Quantificação de proteínas solúveis no tecido de raiz para os tratamentos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey.



Fonte: Próprio autor.

O H_2O_2 , classificado como uma ROS, apresentou interação significativa genótipo/tratamento na folha (Figura 4.7A), sendo que a cultivar BR16 apresentou maior acúmulo de ROS nas condições de controle e seca, enquanto que a linhagem 1Ea2939 permaneceu estável em todas as condições. Na raiz, não houve interação significativa quanto ao acúmulo de H_2O_2 (Figura 4.7), somente efeito simples de genótipo (Figura 4.7B) e de tratamento (Figura 4.7C). As plantas sob condição de encharcamento apresentaram menor quantidade de ROS que as plantas sob seca ou controle. Já para o efeito de genótipo, a cultivar BR16 apresentou valores superiores em comparação a linhagem GM.

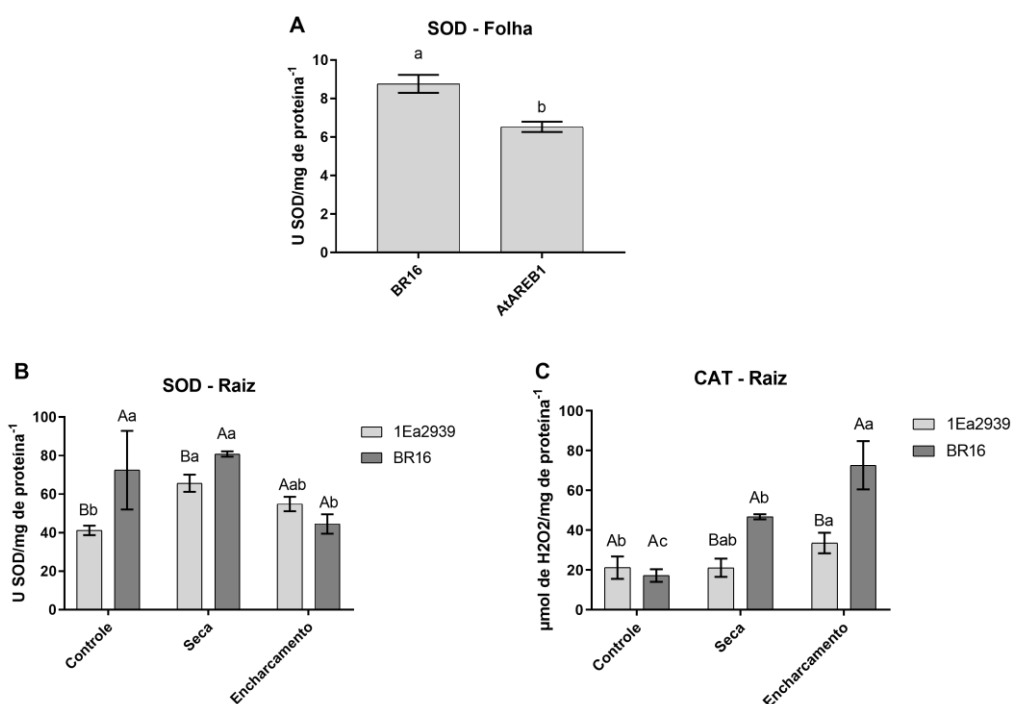
Figura 4.7 – Quantificação do conteúdo de H_2O_2 nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de H_2O_2 no tecido de folha; B) Quantificação de H_2O_2 no tecido de raiz para os genótipos; C) Quantificação de H_2O_2 no tecido de raiz para os tratamentos. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo.



Fonte: Próprio autor.

Para as enzimas antioxidantes (Figura 4.8), na folha observou-se o efeito simples de genótipo (Figura 4.8A) com maior conteúdo de SOD na cultivar BR16 em comparação com a linhagem GM. Para a CAT não foram observados efeitos significativos. Na raiz houve interação entre genótipo/tratamento tanto para SOD quanto para CAT. A cultivar BR16 apresentou maior conteúdo de SOD em comparação com a linhagem GM nas condições de seca e controle (Figura 4.8B). A enzima CAT foi mais ativada no encharcamento (Figura 4.8C), com maior atividade na cultivar BR16.

Figura 4.8 – Quantificação de enzimas antioxidantes nos tecidos de folha e raiz para genótipos de soja submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Quantificação de SOD no tecido de folha para os genótipos; B) Quantificação de SOD no tecido de raiz; C) Quantificação da atividade de CAT no tecido de raiz. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). Letras representam diferenças estatísticas pelo método de Tukey, em resultados que há interação a letra maiúscula representa efeito de genótipo dentro de tratamento; Letra minúscula representa efeito de tratamento dentro de genótipo.



Fonte: Próprio autor.

4.4.3 Análises dos Dados de Expressão Gênica

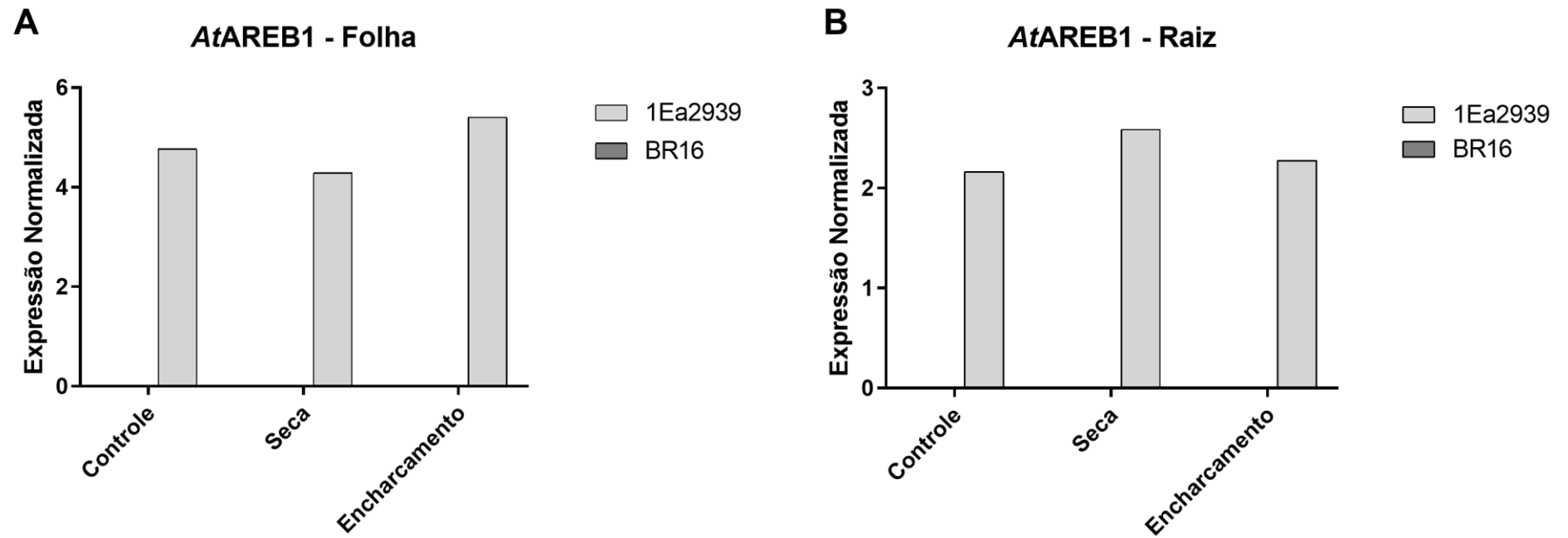
Os dados de PCR em tempo real confirmam a expressão do transgene *AtAREB1* (Figura 4.9) na linhagem GM 1Ea2939. Por estar sob controle do promotor constitutivo 35S, a expressão ocorreu inclusive na condição controle tanto na folha (Figura 4.9A), como também em raiz (Figura 4.9B).

Com relação ao gene *NCED* (Figura 4.10), observou-se que o gene *NCED* foi significativamente mais expresso em todos os tecidos e estresses na linhagem transgênica em comparação com a cultivar convencional.

Para os genes responsivos ao encharcamento, em raiz a *ADH* (Figura 4.11A) apresentou resultado significativo apenas no encharcamento, sendo ativada em ambos os genótipos. Os maiores valores foram atribuídos a cultivar convencional BR16 (18,34 vezes mais expresso no encharcamento na BR16), onde o gene foi mais ativado em comparação com a linhagem GM 1Ea2939 (5,23 vezes mais expresso no encharcamento). Em relação a *AlaAT1* (Figura 4.11B), esse gene foi mais expresso em raízes sob encharcamento, sendo mais fortemente induzido na cultivar convencional, a qual expressou 4,28 vezes mais durante o estresse em comparação com o tratamento controle. Na cultivar BR16 esse gene foi ativado também sob seca, em raiz e folha. O gene *AlaAT2* (Figura 4.11C), não foi ativado no encharcamento em nenhuma das cultivares ou tecidos, sendo observada apenas uma leve *down* regulação desse gene em folhas da cultivar BR16 sob seca. Já para o gene *SuSy* (Figura 4.11D) ele foi *down* regulado em ambos genótipos na folha no tratamento de encharcamento. Já no tecido da raiz o gene foi somente ativado significativamente na BR16 em ambos os estresses.

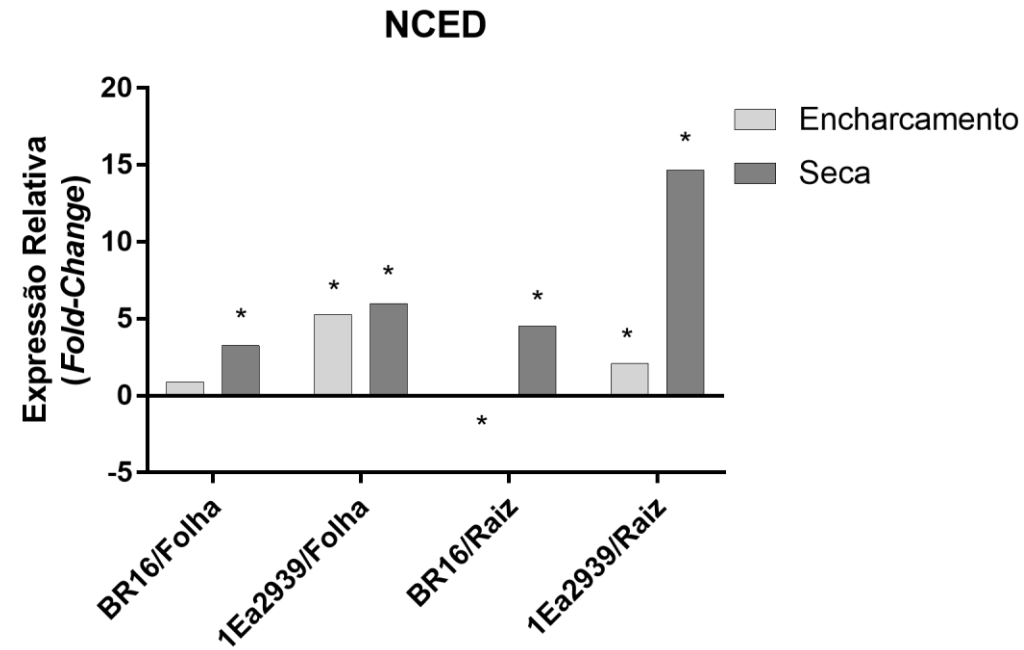
Com relação aos genes responsivos a seca, a *LEA18* foi ativada somente sob seca (Figura 4.11E), sendo a maior expressão observada em raízes e em maior intensidade na cultivar BR16. A desidrina (Figura 4.11F) também foi altamente regulada sob seca, nesse caso a maior ativação foi em folha e assim como a *LEA18*, a maior expressão foi na BR16 em comparação a linhagem GM. O gene que codifica para *HSP70* (Figura 4.11G) apresentou perfil semelhante a *LEA 18* sendo mais expresso em raiz e na cultivar BR16.

Figura 4.9 – Expressão do gene da construção 35S-*AtAREB1* em tecido de folha e raiz nos genótipos submetidos às condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Expressão do gene *AtAREB1* em folha; B) Expressão do gene *AtAREB1* em raiz. 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-*AtAREB1*); BR16 (*background* convencional). A normalização da expressão foi realizada com base nos genes endógenos *β-actina* para a condição de encharcamento e seca, adicionalmente foi utilizado o gene endógeno *FYVE* para a condição de seca.



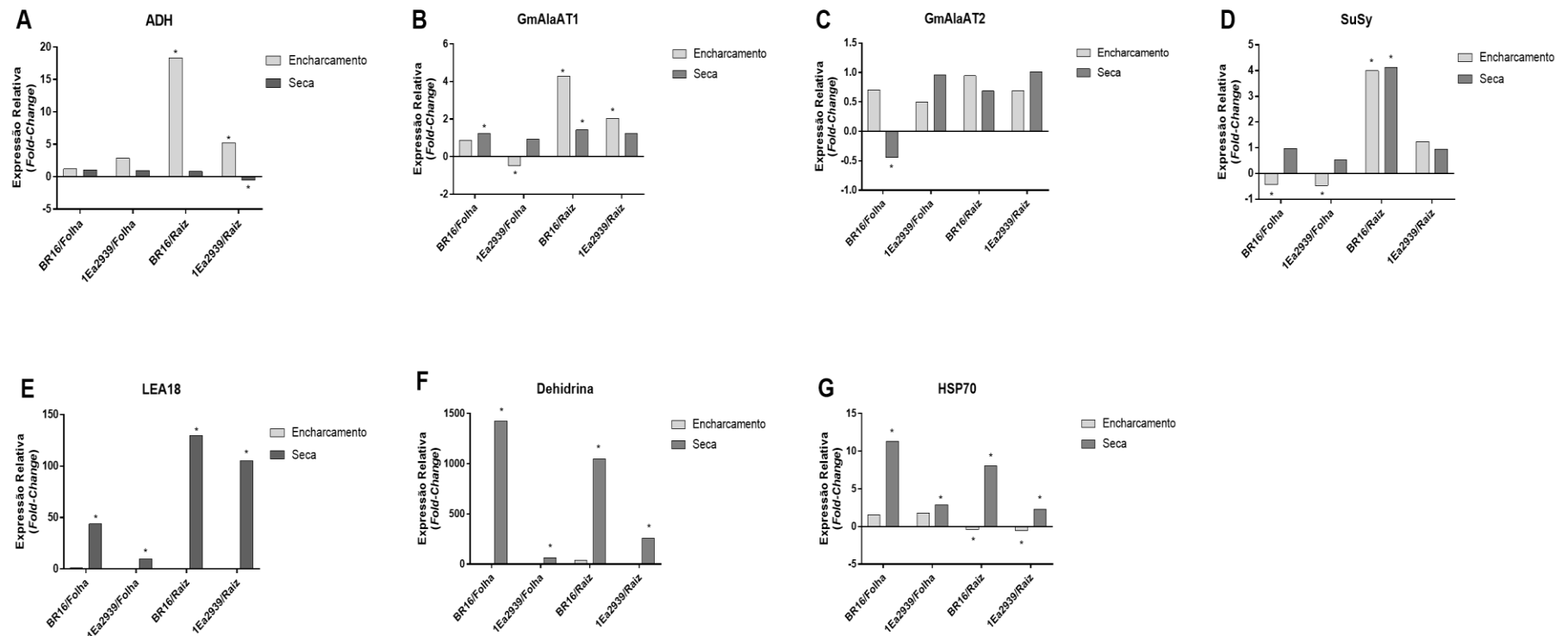
Fonte: Próprio autor.

Figura 4.10 – Expressão do gene *NCED* (Glyma15g40070) em tecido de folha e raiz nos genótipos de soja submetidos as condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A calibração foi realizada com base nas plantas do mesmo genótipo na condição controle. *Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).



Fonte: Próprio autor.

Figura 4.11 – Expressão dos genes responsivos ao encharcamento e a seca em tecido de folha e raiz nos genótipos de soja submetidos as condições de suficiência hídrica, encharcamento e seca. A) Expressão do gene *ADH* (Glyma.04G240800); B) Expressão do gene *AlaAT1* (Glyma.07G045900); C) Expressão do gene *AlaAT2* (Glyma.01G026700); D) Expressão do gene *SuSy* (Glyma13g17420); E) Expressão do gene *LEA18* (Glyma.17G164200); F) Expressão do gene desidrina (Glyma.09G185500); G) Expressão do gene *HSP70* (Glyma.17G072400). 1Ea2939 (linhagem GM com a construção 35S-AtAREB1); BR16 (*background* convencional). A calibração foi realizada com base nas plantas do mesmo genótipo na condição controle. *Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).



Fonte: Próprio autor.

4.5 DISCUSSÃO

Em condições de estresses abióticos como a deficiência hídrica e o encharcamento, as plantas ativam uma série de respostas adaptativas a nível molecular, bioquímico e fisiológico. Os resultados desse estudo mostram o impacto desses estresses na linhagem GM 1Ea2939 superexpressando, o TF *AtAREB1*, e em sua respectiva isolinha convencional, a cultivar BR16. Mudanças mais profundas na fisiologia da planta foram observadas mediante estresse por seca, o que levou a uma redução acentuada das trocas gasosas.

O efeito positivo da inserção do gene *AtAREB1* nos mecanismos de tolerância a seca foram percebidos através das trocas gasosas, onde as plantas transgênicas se destacaram por manterem os processos fisiológicos como abertura estomática, fotossíntese, respiração, mesmo sob condições de déficit hídrico severo. Esses resultados corroboram com trabalhos prévios conduzido por Marinho *et al.* (2015), onde a linhagem 1Ea2939, também apresentou maiores valores de transpiração e condutância estomática sob déficit hídrico. Ainda, segundo o estudo conduzido por Barbosa *et al.* (2012), a inserção do gene *AtAREB1* promoveu aumento na sobrevivência de plantas após déficit hídrico de cinco dias e três dias de reidratação, sendo que as plantas transgênicas apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto a cultivar convencional apresentou somente 40% de sobrevivência.

A seca pode causar significativa inibição da fotossíntese, sendo o decréscimo da difusão de CO₂ da atmosfera até o sítio de carboxilação considerado a principal causa da diminuição da fotossíntese (CHAVES *et al.*, 2009; PINHEIRO; CHAVES, 2011). Essa limitação inclui interferências estomáticas e do mesófilo (FLEXAS *et al.*, 2009), onde esses eventos são decorrentes da redução da turgescência das células-guardas dos estômatos, seguidos pelo fechamento dos poros estomáticos (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Segundo da Silva *et al.* (2013), quando o turgor celular é mantido, os processos como condutância estomática, assimilação de CO₂ e a expansão de tecidos vegetais permanecem estáveis.

Mudanças na fisiologia das plantas foram também induzidas pelo encharcamento, destacando-se novamente a superioridade da linhagem GM, que

mesmo sob estresse, manteve maior taxa fotossintética, destacando-se quanto a eficiência instantânea no uso da água e eficiência instantânea de carboxilação. Com relação à fotossíntese (Figura 4.1B), tanto a seca (PINHEIRO; CHAVES, 2011) como o encharcamento (CAUDLE; MERICLE, 2012) podem diminuir sua eficiência, devido ao fechamento estomático e a diminuição da assimilação de CO₂. A linhagem 1Ea2939 manteve maior fotossíntese, demonstrando uma maior adaptação ao estresse em relação a cultivar BR16. Esses dados corroboram com os encontrados em estudos com déficit hídrico por Barbosa *et al.* (2012) e Marinho *et al.* (2015), e geram novos dados sobre a caracterização das plantas GM no excesso hídrico.

As plantas da linhagem GM também se destacaram em relação ao teor de clorofila (Figura 4.1A), a qual foi superior em relação a cultivar convencional independente da condição hídrica. Esse dado corrobora com os resultados da fotossíntese (Figura 4.1B), tendo em vista que a clorofila está diretamente relacionada à fotossíntese e à assimilação de carbono, podendo ter reflexos na produtividade de grãos (TAIZ; ZEIGER, 2013; MORRISON; VOLDENG; COBER, 2000). As plantas transgênicas foram capazes de manter maiores taxas de fotossíntese, com menor perda de água pela condutância estomática (Figura 4.2C) e com a mesma disponibilidade de CO₂ da cultivar convencional (Figura 4.2B), sob ambos os estresses, indicando uma maior eficiência na produção de energia através da fotossíntese e resultando em melhor desempenho sob estresse.

Para massa seca de plantas, independente da condição hídrica, observa-se que as plantas da linhagem transgênica 1Ea2939 apresentam um crescimento inicial mais lento em comparação ao seu *background* (Figura 4.3A, Figura 4.4A e Figura 4.5). Entretanto, passado o período de estresse, a linhagem 1Ea2939 apresentou maior altura comparado a cultivar BR16 (Figura 4.4C e Figura 4.5), em consequência do aumento do período vegetativo observado nesses materiais. Com isso, a linhagem transgênica acumulou reservas por um período maior. Este maior período de crescimento associado à maior fotossíntese (Figura 4.1B) contribuiu para que a linhagem 1Ea2939 apresentasse uma melhor recuperação após o estresse até seu período reprodutivo. O aumento do ciclo na linhagem transgênica 1Ea2939 em comparação a cultivar BR16 já foi observado em estudo prévio conduzido por

Fuganti-Pagliarini *et al.* (2017), onde as plantas transgênicas apresentaram o ciclo de 150 dias em condição ideal de irrigação e de 153 dias em condição de seca, enquanto a cultivar convencional o ciclo variou de 128 em condição ideal de irrigação e 132 dias em condição de seca.

Com relação as alterações bioquímicas, independente da condição hídrica, a linhagem GM apresentou maior concentração de proteínas solúveis nos tecidos de raízes e de folhas (Figura 4.6A e Figura 4.6B), indicando um efeito da expressão constitutiva do gene *AtAREB1* através do promotor 35S (Figura 4.9). As proteínas estão localizadas em toda célula vegetal e são fundamentais para a estrutura e funcionamento da célula (BRAY *et al.*, 2000). Cerca de 40% das proteínas solúveis presentes em tecidos fotossintéticos são rubisco (FELLER; ANDERS; MAE, 2008), o que pode estar refletindo na maior atividade fotossintética observada nas plantas GM desse estudo (Figura 4.1B).

O acúmulo de proteínas também foi observado em raízes sob estresse por encharcamento, para ambos os genótipos testados (Figura 4.6C). Por ser o tecido que permanece submerso durante o excesso hídrico do solo, a raiz é o órgão mais afetado nessa condição de estresse (SAKAZONO *et al.*, 2014). Segundo Sachs *et al.* (1980), o estresse anaeróbico induz mudanças tanto no teor quanto no padrão das proteínas. Sob condições de estresse, a síntese de proteínas pode ser aumentada visando à estabilização de membranas celulares, ou ainda, a sinalização atribuída ao estímulo do estresse (TESTER; DAVENPORT, 2003). Geralmente espécies tolerantes ao déficit de oxigênio conseguem manter o nível proteico, mediante a síntese de polipeptídeos anaeróbicos, compensando, com isso, a repressão de proteínas aeróbicas (ZHANG *et al.*, 1994; SACHS *et al.*, 1996).

Condições de estresse induzem também a produção de ROS, que quando acumuladas em altas concentrações são tóxicas para a planta, podendo levar até a morte celular. Em baixas concentrações, no entanto, esses compostos podem atuar como molécula sinalizadora do estresse (GECHEV; HILLE, 2005; NEIL *et al.*, 2002; QUAN *et al.*, 2008; UCHIDA *et al.*, 2002). Logo, a quantificação de ROS e da atividade de enzimas que atuam no seu controle, auxiliam na compreensão dos mecanismos que a planta utiliza em situações de estresse. Essas avaliações

indicam se a mesma está sofrendo com o desbalanço das ROS e de enzimas antioxidantes, ou se a mesma está em equilíbrio e utilizando as ROS como moléculas sinalizadores para se adaptar a situação através de respostas ao estresse, como a expressão de genes, e ativação de vias de defesa vegetal (MITTLER *et al.*, 2011; NEIL *et al.*, 2002).

O H_2O_2 , considerada uma ROS, é uma molécula capaz de difundir-se livremente através de membranas, sendo importante tanto para sinalização em processos de tolerância cruzada (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010; FOYER; NOCTOR, 2003), como também, pode acarretar em toxicidade no caso do seu desbalanço (HENZLER; STEUDLE, 2000). Esse composto induz processos de sobrevivência ao estresse como: fechamento estomático, formação de ligações transversais na parede celular, expressão de genes de resposta, biogênese de peroxissomos, no entanto ele também pode inativar enzimas e provocar danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (NEILL *et al.*, 2002; GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER *et al.*, 2011).

Em folha, a cultivar BR16 apresentou maiores níveis de H_2O_2 nas condições de controle e seca (Figura 4.7A). Da mesma forma, Silva (2017), observou o aumento na concentração de H_2O_2 em folhas de soja após déficit hídrico seguido de reidratação. A primeira linha de defesa contra as ROS é a ação da SOD, através da desintoxicação de ânion superóxido (O_2^-) levando a formação de H_2O_2 (GIANNOPOLITIS *et al.*, 1977; ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). A linhagem 1Ea2939 apresentou menos unidades de SOD nas folhas em comparação com a BR16 (Figura 4.8A). Esse resultado, associado a maior concentração de H_2O_2 (Figura 4.7A), indicam que na cultivar BR16, a conversão de O_2^- em H_2O_2 está ocorrendo em maior escala, podendo ser um indicativo de estresse mais severo.

Resultado semelhante foi observado nas raízes, onde as plantas transgênicas apresentaram menor concentração de H_2O_2 em todas as condições testadas (Figura 4.7B) e menor atividade de SOD, sob as condições controle e seca (Figura 4.8B). Ainda em raízes, observou-se que a enzima CAT apresentou maior atividade na cultivar BR16 (Figura 4.8C), nas condições de seca e encharcamento, corroborando com a hipótese de que o estresse foi sentido de forma mais intensa na cultivar

convencional. No trabalho de Damanik, Marbun e Sihombing (2016), os níveis de CAT foram incrementados em genótipos sensíveis ao encharcamento, semelhante ao que ocorreu com a cultivar BR16. Maior atividade da CAT em raízes também foi descrito sob seca em espécies, incluindo soja (MASOUMI *et al.*, 2010), grão de bico (MAFAKHERI *et al.*, 2011), canola (MIRZAEI; MOIENI; GHANATI, 2013) e trigo (NADERI *et al.*, 2014).

Com relação aos dados moleculares, foi comprovada a expressão do gene *AtAREB1* (Figura 4.9) nas plantas da linhagem 1Ea2939 nas diferentes condições testadas, incluindo o controle. Em estudo conduzido por Marinho *et al.* (2015) o efeito do promotor constitutivo 35S nas plantas do evento 1Ea2939 induziu uma série de mudanças fisiológicas, as quais foram percebidas mesmo na condição controle.

Visto a necessidade da síntese de ABA para ativação do FT AREB foi realizada a quantificação da expressão do gene *NCED* (Figura 4.10), o qual codifica uma enzima da rota de biossíntese do ABA. Essa enzima catalisa a clivagem de 9-cis-neoxantina em xantoxina, a qual é convertida em ABA através de uma reação de duas etapas da via do ABA-aldeído (XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002). A partir disso, pode-se constatar que, através do aumento da expressão desse gene, e consequentemente da síntese da enzima, pode haver um aumento na produção do hormônio ABA, fundamental para ativação de AREB (FURIHATA *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.*, 2010). A produção e expressão de ABA foi bastante caracterizada em estresses como a seca (XIONG; ZHU, 2002) e o estresse salino (ZÖRB *et al.*, 2013). Porém os dados da presença desse hormônio, em plantas que sofrem por estresse por encharcamento, são incipientes e controversos (HSU *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2016), sendo relatado hipóxia em *A. thaliana* (YEUNG *et al.*, 2018). No presente trabalho, demonstrou-se a ativação desse gene, como previsto, no estresse por seca em ambos genótipos em todos os tecidos. Já no encharcamento, foi observado que esse gene foi significativamente *up* regulado na linhagem 1Ea2939, demonstrando que o FT AREB pode ser ativado e consequentemente ativar os mecanismos de resposta ao estresse para o encharcamento. Esse resultado, em conjunto com os resultados de fisiologia e bioquímica corroboram com

a hipótese de que a inserção do gene FT AREB contribui para obtenção de plantas mais tolerantes ao estresse por encharcamento.

Para os genes estresse responsivos, observou-se a ativação tanto dos genes responsivos a seca *LEA18*, *HSP70* e *dehidrina*, como também para os genes responsivos ao encharcamento *ADH*, *AlaAT1* e *AlaAT2*. Em ambas as condições de estresse esses genes foram modulados de forma mais intensa na cultivar BR16 comparado com a linhagem GM. Corroborando com os dados fisiológicos observados, os quais sugerem que a linhagem GM AtAREB1 sente menos os efeitos do estresse em comparação ao *background* convencional.

O gene que codifica para a enzima ADH (álcool desidrogenase) foi previamente descrito como induzido por hipóxia em soja por Nakayama *et al.* (2017). Essa enzima catalisa a redução do acetaldeído tóxico a etanol, sendo o gene que a codifica ativado sob hipóxia e anóxia (PREISZNER *et al.*, 2001). A indução da ADH sob encharcamento ocorreu somente nas raízes, por ser esse o tecido que permanece sob inundação (Figura 4.11A). Essa indução também foi superior na cultivar convencional, a qual indica que a mesma necessitou da maior ativação da glicólise, para produção de energia, e conseqüentemente maior ativação das vias fermentativas, para manutenção da glicólise e do pH citósolico (GOOD; CROSBY, 1989), para sua sobrevivência frente ao estresse, demonstrando que a mesma se encontrava mais estressada em comparação com a linhagem transgênica, por esse ser um mecanismos de sobrevivência essencial em baixa concentração de oxigênio (CHRISTIANSON *et al.*, 2010). No trabalho de Rizal e Karki (2011), demonstrou-se que houve maior expressão de ADH em plantas sensíveis ao estresse em comparação com plantas mais tolerantes ao encharcamento.

Outro gene avaliado relacionado com a proteína *Sucrose synthase (SuSy)* foi avaliado no estudo (Figura 4.11D). Essa proteína está associada ao metabolismo da sacarose, e age como sintetase ou invertase. A sacarose é degradada pela SuSy em UDP-glicose, sendo uma reação reversível. Sob a ação de invertase, a sacarose é invertida em frutose e glicose (JIANG *et al.* 2015). No presente trabalho o gene foi significativamente expresso no tecido de raiz em ambos os estresses hídricos na cultivar convencional. A expressão de SuSy é afetada pelo encharcamento, sendo

induzida durante o estresse, visto que a sua ação auxilia na produção de glicose que pode ser utilizada pela glicólise (JACKSON; COLMER, 2005). Como observado a BR16 apresentou alta expressão durante o encharcamento nas raízes, demonstrando que a mesma foi mais afetada pelo estresse tendo que ativar de forma mais intensa as vias de produção de energia, o que pode ser relacionado com a maior expressão do gene *ADH* na cultivar convencional (Figura 4.11A), visto que pelo fato dela estar sofrendo mais com estresse, teve que consumir mais reservas de glicose para produzir ATP e conseqüentemente necessitou de uma maior regeneração de NAD^+ , o qual ocorre pelas vias fermentativas, conseqüentemente apresentando um aumento na indução do gene *ADH*. A expressão de *SuSy* também foi reportada em soja no estudo de Nakayama *et al.* (2017), sendo o gene induzido no estresse por encharcamento nas cultivares de soja BR4 e Embrapa45, não havendo diferenças entre o genótipo sensível e tolerante.

O resultado de expressão do gene *SuSy*, observado no presente trabalho também pode estar associado o maior crescimento (Figura 4.2A) e peso de massa seca (Figura 4.3A) da cultivar convencional em ambos os estresses, em estudos realizados com tabaco por Coleman *et al.* (2006) observou-se um aumento no crescimento e produção de biomassa em plantas que superexpressavam o gene *SuSy*. O aumento da biomassa de plantas de algodão transgênicas superexpressando o gene *SuSy* (*GhSuSA1*) também foi relatado por JIANG *et al.* (2012). O aumento da biomassa pode estar relacionado ao fato de que a UDP-glicose é precursora da celulose (COLEMAN *et al.*, 2006).

Os genes que codificam para a enzima AlaAT (alanina aminotransferase) também foram alvos desse estudo (Figura 4.11B e Figura 4.11C). Durante o encharcamento ocorre o estresse por hipóxia, devido à baixa concentração de oxigênio, o que limita a produção de energia pelas vias aeróbicas. Sendo assim, para a obtenção de energia, três vias anaeróbicas principais são ativadas durante o estresse: a via do etanol, a do ácido láctico e uma via que é específica de plantas, que produz alanina, envolvendo a enzima AlaAT, que produz a partir do piruvato a alanina que além de conservar os esqueletos de carbono e o nitrogênio, também consome os íons H^+ responsáveis pela acidificação do citoplasma que ocorre

através da ativação das vias fermentativas (RICARD *et al.*, 1994; DENNIS *et al.*, 2000; SOUSA; SODEK, 2002). Em plantas sob condições normais de oxigenação, essas vias estão ausentes ou com atividade bastante reduzida, mas são rapidamente induzidas em baixa concentração de O₂, logo, o acúmulo de alanina durante a hipóxia tem significativa importância no retorno à normóxia pela conversão da alanina em piruvato por meio da reação de transaminação catalisada pela atividade da enzima alanina aminotransferase (SOUSA; SODEK, 2002; MIYASHITA; GOOD, 2008).

Para o trabalho, dois genes da *AlaAt* de soja foram selecionados, sendo o Glyma.07G04590 que codifica para AlaAT1 da subclasse I e o Glyma.01G026700 denominada como GmAlaAT2 da subclasse II, e a partir de sua expressão podemos avaliar a ativação da via de produção de alanina. Como demonstrado através desse trabalho, o gene *AlaAT2* (Figura 4.11C) não obteve resultados significativos no excesso hídrico, somente foi *down* regulado nas folhas de BR16 durante a seca, resultado pouco expressivo. O fato da expressão de *AlaAT2* ter sido menos significativa no encharcamento foi comprovado também por Rocha (2010), o qual constatou que a indução do gene *AlaAT1* foi mais intensa do que a *AlaAT2*. Isso ocorre, pois, o gene da *AlaAT2* é expresso somente na mitocôndria, a qual não é intensivamente afetada durante o estresse.

Enquanto o gene *AlaAT1* (Figura 4.11B), ao contrário da *AlaAT2*, é expresso no citosol, que é significativamente afetado em situações de hipóxia, o qual é acidificado pela liberação de H⁺ liberado pelas vias fermentativas. Sendo por esse motivo que ocorreu a alteração da expressão desse gene no estudo, sendo induzido no encharcamento em raízes de ambos genótipos, sendo mais expressivo na BR16, demonstrando que as rotas foram ativadas em ambos genótipos, porém, mais significativamente na cultivar convencional. Observou-se que a linhagem 1Ea2939 apresentou regulação negativa da expressão dessa enzima nas folhas durante o encharcamento, resultados semelhantes ao descrito por Jain *et al.* (2010), que observou um decréscimo na expressão dessa enzima nas folhas de sorgo a partir de 12 horas de estresse, enquanto nas raízes os valores foram aumentando exponencialmente. Outros estudos como de Good e Crosby (1989) também

relataram elevação da atividade de AlaAT em raízes de cevada, mas a atividade diminuiu em tecido foliar.

Na seca, os dados de expressão também demonstraram a ativação do gene *AlaAT1* na cultivar BR16 em folhas e raízes. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que a transaminação é um passo fundamental na biossíntese de vários aminoácidos a partir de glutamato (HODGES, 2002). No estudo de Xie *et al.* (2018), onde estudou-se duas enzimas aminotransferases, a alanina aminotransferase (AlaAT) e asparato aminotransferase (AspAT) em milho, foi relatado um aumento na atividade de ambas enzimas durante o período inicial de seca. A atuação dessas enzimas no estresse resulta no aumento da concentração de aminoácidos que agem como solutos citoplasmáticos compatíveis para a proteção de organelas e biomoléculas celulares, reduzindo assim os efeitos adversos da seca (MUNNS; TESTER, 2008).

Para os genes responsivos a seca, o gene *LEA18* foi altamente expresso nessa condição (Figura 4.11E), concordando com resultados prévios como Asakura *et al.* (2012) e Fuganti-Pagliarini *et al.* (2017). A expressão desse gene sob seca ocorreu em ambos os tecidos e genótipos, porém, assim como os genes responsivos ao encharcamento, uma maior ativação foi observada na cultivar sensível BR16.

A *dehidrina* é um gene expresso majoritariamente em condições de seca e frio (PUHAKAINEN *et al.*, 2004), isso explica porque o gene não foi ativado sob encharcamento (Figura 4.11F). Em trabalho realizado por Zhang, Moloney e Chinnappa, (1996), pela técnica de *northern blot*, a dehidrina se mostrou presente nos tratamentos com ABA, PEG e seca, porém, não foi detectada no encharcamento. Sob seca, a maior expressão da dehidrina foi observada na cultivar convencional devido a sua maior susceptibilidade ao estresse. As dehidrinas, em sua função, supostamente realizam a estabilização da membrana, agindo como chaperonas para evitar a agregação e/ou inativação de proteínas sob desidratação (GRAETHER; BODDINGTON, 2014).

O gene *HSP70*, que codifica para uma proteína da família *Heat Shock Protein* (HSP), mais especificamente como chaperona molecular GRP78/BiP/KAR2, HSP70

superfamily (ROBERTS, 1991), tem função no dobramento, montagem, translocação e degradação de proteínas sob condições de estresse e em muitos processos celulares normais (PARK; SEO, 2015). Apesar de serem inicialmente caracterizadas como proteínas associadas a alta temperatura, atualmente sabe-se que elas podem ser induzidas por uma ampla variedade de estresses (PARK; SEO, 2015; AL-WHAIBI, 2011). No presente estudo a HSP70 foi induzidas somente na seca (Figura 4.11G), e como os demais genes estresse responsivos foi mais ativada na cultivar sensível em comparação a linhagem GM.

4.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam o desempenho superior das plantas superexpressando o gene *AtAREB1* sob condições de seca e indicam o desempenho superior dessa linhagem sob estresse por encharcamento.

Sob o estresse por encharcamento, as plantas transgênicas mantiveram maior fotossíntese, maior eficiência intrínseca no uso da água e maior eficiência instantânea de carboxilação em comparação a cultivar convencional BR16.

Observou-se ainda, que as plantas do evento transgênico apresentaram um crescimento inicial mais lento, seguido, no entanto, de um aumento do período vegetativo, permitindo que as mesmas recuperassem o crescimento de forma mais eficiente no período pós estresse.

Adicionalmente, o evento transgênico apresentou maior concentração de proteína e menor concentração de peróxido de hidrogênio, sugerindo um controle mais eficiente no balanço das ROS.

As plantas transgênicas também apresentaram uma menor ativação de genes do metabolismo fermentativo e da produção de alanina, sugerindo que nesses materiais o estresse ocorreu de forma menos intensa. Além disso, houve a ativação do gene NCED no encharcamento, indicando que há um aumento na biossíntese de ABA, havendo assim a ativação do FT AREB e de suas resposta igualmente no estresse de encharcamento quanto na seca.

5 ARTIGO B: PERFIL DE EXPRESSÃO DA HEMOGLOBINA NÃO SIMBIONTE CLASSE 1 (*nsHb-1*) EM SOJA SOB CONDIÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO POR SECA E ENCHARCAMENTO

5.1 RESUMO

As hemoglobinas (Hbs) são amplamente distribuídas em plantas superiores e, como a hemoglobina animal, têm uma função na ligação de oxigênio. Existem três classes de Hbs, a hemoglobina simbiótica, não-simbiótica (*nsHb*) e truncada. Muitos estudos têm destacado o importante papel das hemoglobinas não simbióticas de classe 1 (*nsHb-1*) nas respostas aos estresses abióticos em plantas. Entretanto, em soja a caracterização dos genes *nsHb-1* sob estresse hídrico, como encharcamento e seca ainda carece de estudos. Neste trabalho, avaliamos o perfil de expressão de genes *nsHb-1* em soja sob condições de encharcamento e seca. Foram identificados em soja setes genes contendo o domínio *plant globin*, sendo que dentre esses, somente três apresentaram perfil de expressão diferencial em bibliotecas de RNA-seq de hipóxia (simulação de encharcamento) e seca. Os genes identificados como *nsHb-1* foram Glyma.11G121700.1 e Glyma.11G121800.1, enquanto que o gene Glyma.20G191200.1 foi identificado como uma leghemoglobina. Os dados obtidos foram validados por meio de PCR em tempo real em plantas submetidas ao estresse por encharcamento e seca em casa de vegetação. Observou-se uma maior expressão do Glyma.11G121800.1 na condição de encharcamento. Ambos os genes da hemoglobina não-simbiótica identificados estão estreitamente relacionados com o estresse abiótico, mostrando que o Glyma.11G121800.1 é mais expresso no estresse por encharcamento e Glyma.11G121700.1 é expresso em ambas condições de estresse, sendo mais significativo na seca. Apesar da semelhança do Glyma.20G191200.1 com os demais, o mesmo caracteriza-se como uma leghemoglobina, apresentando um perfil de expressão que não foi induzido pelos estresses. Esses dados sugerem que em soja as *nsHbs-1* atuam no encharcamento

e também ampliam a caracterização da expressão desses genes nas condições de encharcamento e seca em soja.

5.2 INTRODUÇÃO

As Hemoglobinas vegetais (Hb) são proteínas que foram inicialmente descritas em nódulos de soja em 1939 (KUBO, 1939), as quais, em analogia com o que ocorre nas hemoglobinas animais, têm propriedade de se ligar ao oxigênio. As Hbs estão presentes em todos os organismos vivos e possuem diferentes funções e estruturas, de acordo com Weber e Vinogradov (2001).

As Hbs de plantas podem ser classificadas em três tipos, as hemoglobinas simbióticas, as hemoglobinas não simbióticas (nsHb) e hemoglobinas truncadas (TREVASKIS *et al.*, 1997). Hbs simbióticas, também chamadas de leghemoglobinas, são produzidas em alta concentração em nódulos radiculares, enquanto as Hbs não simbióticas são sintetizadas em outros tecidos, sem relação com a simbiose (GUPTA *et al.*, 2011). As Hbs truncada são similares as não simbióticas, mas apresentam tamanho reduzido, porém foram pouco caracterizadas (WATTS *et al.*, 2001).

Cada classe é representada por um único gene no genoma de *Arabidopsis thaliana* (TREVASKIS *et al.*, 1997; WATTS *et al.*, 2001). As hemoglobinas não simbióticas (nsHb) são classificadas em duas classes, a classe 1 e a classe 2. A hemoglobina não simbiótica de classe 1 (nsHb-1) é mais expressa sob estresse por hipóxia do que em condições normais, principalmente devido à sua maior afinidade ao oxigênio, mas também pode ser expressa sob outras condições de estresse, como frio, estresse osmótico, deficiência de nutrientes e exposição ao óxido nítrico (DORDAS, 2009). A nsHb-1 pode interagir com o oxigênio de diversas formas, atuando como carreadoras e armazenadoras de oxigênio, para facilitar a sua difusão; como sensores de oxigênio, para regular a expressão de proteínas durante períodos de hipóxia ou anóxia; ou como oxigenases terminais no metabolismo (HILL, 1998). Já a hemoglobina não simbiótica de classe 2 (nsHb-2) possui menor afinidade ao oxigênio e age facilitando o suprimento de oxigênio aos tecidos em desenvolvimento (GUPTA *et al.*, 2011).

As propriedades estruturais da nsHb-1 permitem que elas sirvam como proteínas solúveis de transporte de elétrons no sistema enzimático de óxido nítrico (NO), o qual é produzido em baixas condições de oxigênio, principalmente pela redução de nitrito nas plantas (DORDAS *et al.*, 2003). O NO atua como sinalizador de uma grande variedade de processos nas plantas, incluindo mecanismos de respostas a estresses bióticos e abióticos.

Nesta linha, a nsHb-1 age como um elemento relacionado ao metabolismo do NO, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao nitrogênio, sendo produzida durante condições de estresses. O papel da nsHb-1, atribuído a modulação de NO, é por sua ação como uma dioxigenases de NO, associada a oxidação de NADH e, assim, mantém a glicólise, mesmo em baixa concentração de oxigênio (DORDAS *et al.*, 2003; IGAMBERDIEV; HILL, 2004; MOTJ, 2014). O NO é oxidado a nitrato pelas nsHbs-1, esse metabolismo recebe a nomenclatura de ciclo nsHb/NO (IGAMBERDIEV *et al.*, 2005). O nitrato obtido é reduzido a nitrito por CNR (nitrato redutase citosólica), que é ativada em condições de baixo pH que ocorre em situações de hipóxia, quando em condições aeróbicas essa enzima está fosforilada e conseqüentemente inativa (IGAMBERDIEV; HILL, 2004). O nitrito formado, por ser altamente reativo, é rapidamente reduzido para amônio por NiR (nitrito redutase), rota que depende de altas reservas energéticas, sendo então é desviada para ser convertida novamente em NO pela NR (nitrato redutase), visto que há baixa disponibilidade de energia em hipóxia, e que por fim pode ser utilizado para produção de aminoácidos (ARC *et al.*, 2013). Durante estas vias, os NAD(P)H são oxidados para NAD(P)+, mantendo o fluxo glicolítico e, portanto, a viabilidade das células. Além disso, o estado redox do citosol pode ser controlado (MOTJ, 2014).

O gene da *nsHb-1* foi previamente estudado e, de acordo com a literatura, tem a capacidade de conferir tolerância ao encharcamento e ao frio em várias espécies. No estudo de Almada *et al.* (2013), com a espécie *Prunus laurocerasus* aplicou-se o estresse por hipóxia durante 15 dias, com coletas periódicas, e observou-se que a expressão do gene *nsHb-1* foi induzida em raízes em todos os períodos estudados, e que os genótipos mais tolerantes ao estresse apresentaram maiores níveis de expressão do gene, demonstrando a associação do gene com a

capacidade do mesmo de conferir tolerância a hipóxia. No estudo com encharcamento em *Vigna radiata* de Sairam *et al.* (2012) observou-se maior expressão desse gene em plantas submetidas ao encharcamento em comparação com o tratamento controle.

Sabendo que NO atua em diversos processos da planta, principalmente como uma molécula sinalizadora (NARITA, 2010), mas que também é considerado uma ROS, e reconhecido como um agente potencial na morte celular programada em plantas (RICHBURG; AVIV; DANGL, 1998), há a necessidade de sua homeostase na planta, sendo a nsHb-1 já descrita como um mecanismo associado com a desintoxicação de NO (ARC *et al.*, 2013).

No trabalho de Dordas *et al.* (2003) foram utilizados eventos transgênicos de alfafa, nos quais gene *nsHb-1* de cevada foi superexpresso e em outros em que o gene foi silenciado, submetidos a condições de hipóxia com 3% de oxigênio. Através desse experimento constatou-se que as plantas superexpressando o gene *nsHb-1* acumulavam menos NO em comparação ao controle, enquanto as plantas com o gene silenciado apresentaram altos níveis de acúmulo de NO, demonstrando um provável vínculo do gene com a capacidade de desintoxicação da nsHb-1. Além disso, estudos de silenciamento do gene *nsHb-1* em *A. thaliana* demonstraram que a função da nsHb-1 se estende além do estresse por encharcamento, tendo papel fundamental na maturação da planta, mostrando que pelo menos um gene *nsHb* funcional é essencial para a sobrevivência da planta, pois a mesma realiza a regulação dos níveis de NO que tendem a se acumular durante o seu desenvolvimento (DORDAS, 2009; HEBELSTRUP *et al.*, 2006).

Diversos estudos sobre o gene *nsHb-1* vêm sendo realizados em *A. thaliana*. No trabalho de Hunt *et al.* (2001) foi demonstrado que a expressão do gene *nsHb-1* ocorre em plântulas e é induzido também por hipóxia. No estudo de Thiel *et al.* (2011), no qual utilizou-se sementes de *A. thaliana* superexpressando o gene da hemoglobina não simbiote de classe 1 (*AHb1*) de *A. thaliana*, obteve-se sementes mais tolerantes ao encharcamento. Também observou-se que as sementes transgênicas foram capazes de manter baixos níveis de NO endógeno e manter um alto status energético, em contraste com o tipo selvagem, e ao mesmo tempo

comprovou-se que a *AHb1* está envolvida no metabolismo do NO. Resultados semelhantes foram obtidos por Kuruthukulangarakoola *et al.* (2017), os autores observaram aumento nos níveis de expressão de AHb1, conjuntamente com as enzimas NR e NIR, nas plantas em que aplicou-se NO, em comparação com plantas crescidas sob condições normais, demonstrando um incremento no metabolismo de homeostase do NO.

O gene também foi estudado em outras espécies, como no trabalho de Lira-Ruan, Ruiz-Kubli e Arredondo-Peter (2011) no qual identificou-se cinco tipos de nsHbs presentes em arroz. Outro exemplo, pode ser dado pelo estudo com beterraba de Leiva-Eriksson *et al.* (2014), no qual a expressão dos genes foi caracterizada em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, com diferentes fotoperíodos; ou ainda, no estudo de Smagghe *et al.* (2007) identificando a localização das nsHbs em chicória durante a embriogênese somática. Em arroz, Violante-Mota *et al.* (2010), buscou identificar se o gene possuía atividade de peroxidase. Por meio de ferramentas de bioinformática, em *Guillardia theta*, uma alga unicelular flagelada, identificou-se a presença de genes com alta similaridade à *nsHb* (SMITH; VINOGRADOV; HOOGEWIJS, 2014).

Visto que os genes das hemoglobinas não simbiotes foram descritos em diversas espécies, foi confeccionada uma árvore filogenética para verificar a proximidade dentre os genes que possuíam o mesmo domínio que a hemoglobina não simbiote em espécies de leguminosas, além de identificar os melhores candidatos de nsHb-1 de soja para serem utilizados no estudo.

A caracterização do gene também foi realizada mediante outros estresses, como no trabalho de Wang *et al.* (2003), que identificou os níveis de expressão da nsHb em tomate sob diferentes condições nutritivas. Outro exemplo é o trabalho de Sasakura *et al.* (2006) com plantas de *Alnus firma* que demonstrou expressão até 12 vezes maior do gene em plantas submetidas ao frio. A expressão desse gene pode ocorrer até mesmo em estresses bióticos, como no caso do estudo com RNA-seq de Guan *et al.* (2015) que demonstrou aumento da expressão do gene em trigo frente ao ataque de pulgão-da-espiga (*Sitobion Avenae*).

Em soja o gene foi descrito pela primeira vez por Andersson *et al.* (1996), o qual identificou sua expressão em cotilédones, caule de plântulas, raízes, folhas jovens e algumas células dos nódulos associadas com a fixação biológica de nitrogênio. No estudo de Goodman e Hargrove (2001) foi descrita a estrutura da proteína. Porém, poucos esforços têm sido realizados na área para compreensão do funcionamento do gene na soja frente a estresses abióticos. Um dos poucos estudos realizados com nsHb em soja foi o de Nakayama *et al.* (2017) no qual observou-se, através de dados de RTq-PCR e RNA-seq, um aumento da expressão de um gene *nsHb* frente a hipóxia.

O mesmo pode se afirmar com relação ao estresse por seca, em que não há nenhum estudo em plantas caracterizando o gene nesta condição. Todavia, pesquisas demonstram que a indução de mecanismos antioxidantes na seca e no metabolismo associados ao ABA demandam a produção de NO (ZHANG *et al.*, 2009), havendo a possibilidade da ação da nsHb-1 sob esse estresse. Para verificar a expressão das nsHbs-1 tanto no encharcamento quanto na seca, foi realizada a quantificação da expressão dos genes selecionados pelo estudo através do PCR em tempo real.

Os estudos conduzidos até o momento demonstram o envolvimento dos genes de *nsHb-1* sob estresse, contudo, a caracterização dessa classe ainda é incipiente em soja. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar o gene *nsHb-1* de soja em condições de encharcamento e seca, utilizando ferramentas de bioinformática associadas a validação funcional por meio de RNA-seq e PCR em tempo real.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Busca dos Genes com Domínio *Plant Globin* em Bancos de Dados

A busca dos genes contendo o domínio *Plant globin* foi realizada no organismo alvo soja (*Glycine max*), e nas espécies modelo *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*. Foram utilizados dois métodos

de busca, utilizando a palavra-chave “*Plant globin*” nos respectivos bancos de dados de cada espécie e através da sequência dos domínios *Plant globin*.

Para a busca pelos domínios utilizou-se a sequência modelo PS00208 PLANT_GLOBIN: “[SN]-P-x-[LV]-x(2)-H-A-x(3)-F”, obtida no banco de proteínas do Prosite (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS00208>) a partir de busca por palavra-chave “*Plant globin*”. Após a obtenção de domínios para cada espécie, as sequências foram alinhadas na ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), para verificar a semelhança entre as sequências dos domínios. Quando as sequências eram iguais, utilizava-se somente uma para a busca nos bancos de dados específicos para cada espécie.

As sequências putativas de genes, contendo os domínios obtidos para cada espécie, foram obtidas em soja, *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*, nos respectivos bancos SOYKB (<http://soykb.org/>), TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), Lotus BASE (<https://lotus.au.dk/>) e *Medicago truncatula* Genome Database (<http://www.medicagogenome.org/>).

Após a obtenção de cada sequência modelo, os mesmos foram alinhados na ferramenta BLASTp presente nos bancos de dados previamente citados, para encontrar as sequências presentes nestes bancos que possuem o domínio alvo. Em seguida, utilizou-se a ferramenta de análise de domínios proteicos do ProSite (<https://prosite.expasy.org/>) para confirmar as sequências que possuem de fato o domínio *plant globin*, excluindo aquelas que não apresentam o domínio, ou que possuem o domínio incompleto.

As sequências modelos e respectivas informações estão disponíveis no Apêndice A.

5.3.2 Árvore Filogenética

Foi isolado das sequências que possuem o domínio alvo somente a sequência do motivo *Plant globin*. As sequências do domínio foram salvas em um arquivo FASTA, alinhadas no Software MEGA v.7.0.21 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando o algoritmo ClustalW, com os seguintes parâmetros:

Pairwise alignment - Gap opening penalty:10, gap extension penalty:10; multiple alignment - gap opening: 10, gap extension: 0.2. Protein weight matrix: Blosum, gap separation distance: 4. A árvore filogenética foi obtida usando este arquivo como *input* no próprio programa MEGA, utilizando-se o método de *Neighbor-joining tree*, realizando-se 1000 *bootstraps*.

Posteriormente, realizou-se ainda a análise dos domínios presentes em todos os candidatos na ferramenta MEME (BAILEY; ELKAN, 1994) (<http://meme-suite.org/tools/meme>), a fim de encontrar a sequência consenso (LOGO) deste domínio nas espécies em estudo.

5.3.3 Análise da Expressão em Bancos de RNA-Seq

Utilizando a biblioteca de sequenciamento de RNA (RNA-seq) previamente obtidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, provenientes de um experimento de soja sob hipóxia (NAKAYAMA *et al.*, 2017) e outro experimento de soja sob seca (RODRIGUES *et al.*, 2012) avaliou-se a expressão dos genes que contém o domínio *Plant globin* de soja descritos no Apêndice A.

Nas bibliotecas de hipóxia foram utilizadas duas cultivares (BR 4 e Embrapa 45), consideradas sensível e tolerante ao estresse por encharcamento, respectivamente (NAKAYAMA *et al.*, 2017), em diferentes períodos de estresse por hipóxia (0,5 horas, 4 horas e 28 horas), induzido em sistema hidropônico por meio de infusão constante de nitrogênio gasoso. Avaliou-se apenas as raízes, tendo em vista que esse é o tecido que mais sofre as consequências do estresse.

Nas bibliotecas de seca foram utilizadas as cultivares BR16 e Embrapa 48, consideradas como sensível e tolerante a seca, respectivamente (OYA *et al.*, 2004). As plantas foram cultivadas em sistema hidropônico, sendo o estresse imposto através da remoção das plantas da solução nutritiva por diferentes períodos (25 a 50 minutos, 75 a 100 minutos, 125 a 150 minutos).

O sequenciamento e análise de bioinformática foram realizados pela empresa Fasteris SA (Plan-les-Ouates, Switzerland). Detalhes do delineamento experimental e da metodologia utilizada nas etapas de construção das bibliotecas podem ser

consultados em trabalhos prévios de Rodrigues *et al.* (2012) e Nakayama *et al.* (2017).

Para ambas as bibliotecas os resultados foram obtidos em *Reads per Mapped Million* (RPM). Para calcular o valor da expressão (*fold-change*) dos genes foi feita a divisão do valor de abundância de transcritos das plantas em estresse pelas plantas na condição controle. A significância estatística dos genes diferencialmente expressos foi obtida pelo uso do pacote Bioconductor edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010), corrigido pelo método de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Foram considerados apenas os genes diferencialmente expressos que apresentam $fold-change \geq 2$ (*up*) ≤ -2 (*down*), adj. P-value $\leq 0,01$, e com mais de 20 *reads* mapeadas em pelo menos uma das duas bibliotecas comparadas.

5.3.4 Seleção de Genes para Validação por PCR em Tempo Real

A partir das buscas realizadas nas bibliotecas de RNA-seq de hipóxia e seca selecionaram-se três genes que apresentavam perfil diferencialmente expresso: Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1 e Glyma.20G191200.1.

Com as sequências da CDS desses genes obtidas no banco de dados SoyKB (<http://soykb.org/>) foi realizada uma busca no BLASTn (https://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi?PAGE_TYPE=BLASTSearch), com objetivo de encontrar a anotação desses genes. Para confirmar os dados de anotação do BLASTn, realizou-se uma busca utilizando as identificações de cada gene no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Os dados acerca das informações dos genes estão descritos na tabela abaixo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Identificação de hemoglobina não simbiótica em soja. Identificação no modelo antigo (Gene Model V9.0) e atual (G.Max Wm82.A2.V1) e anotação do gene.

| <i>Primeiro Mapeamento (Gene Model V9.0)</i> | <i>Mapeamento Atual (G.Max Wm82.A2.V1)</i> | <i>Referência</i> | <i>Anotação do gene (BLAST)</i> |
|---|---|----------------------------------|--|
| Glyma11g12980 | Glyma.11G121800.1 | (ANDERSSON <i>et al.</i> , 1996) | <i>Glycine max</i> nonsymbiotic hemoglobin |
| Glyma11g12960 | Glyma.11G121700.1 | (CHAN <i>et al.</i> , 2008) | <i>Glycine max</i> non-symbiotic hemoglobin 1-like |
| Glyma20g33290 | Glyma.20G191200.1 | (MARCKER <i>et al.</i> , 1984) | <i>Glycine max</i> leghemoglobin C2 |

Fonte: Próprio autor.

5.3.5 Ensaio de Validação Por PCR em Tempo Real

5.3.5.1 Obtenção do material vegetal

O experimento foi composto pela cultivar convencional BR16 em três tratamentos: seca, encharcamento e controle. Sendo realizadas seis repetições para cada tratamento distribuídas em seis repetições, totalizando 18 plantas.

As plantas inicialmente foram germinadas em papel Germitest® umedecido com o volume de água destilada autoclavada equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco e após cinco dias foram transplantadas para vasos de 1Kg (15 cm diâmetro externo x 10 cm de base e 11 cm de altura) contendo areia e substrato na proporção 1:1, com o substrato contendo terra:areia:composto orgânico na proporção (3:2:2). Foram transplantadas duas plantas por vasos utilizando inoculante Nitragin Cell Tech HC® (Novozymes, Franklinton, North Carolina, EUA). Posteriormente foi realizado o desbaste de uma planta, sobrando uma planta por vaso. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura programada de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$.

O estresse foi aplicado quando as plantas alcançaram o estágio V3 (FEHR; CAVINESS, 1977). A partir desse momento, as plantas foram divididas em três grupos, sendo um composto pela condição controle em que as plantas permaneceram sob condições ideais de cultivo. Outro grupo constituído pelas plantas sob seca e um terceiro grupo, composto pelas plantas submetidas ao encharcamento. Para o estresse por seca as plantas foram submetidas a suspensão da irrigação. Nas plantas submetidas ao encharcamento o vaso foi colocado dentro de outro recipiente, no qual adicionou-se água até formar uma lâmina de 5 cm acima do substrato.

As plantas foram submetidas aos tratamentos permaneceram sete dias em condição de estresse, o qual foi confirmado através de medições da condutância estomática, utilizando o analisador portátil (LI-6400XT, LI-COR), até atingir o valor de $0,02 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerado como valor indicativo de estresse (FLEXAS *et*

al., 2006), quando então foram realizadas as coletas do terceiro trifólio e da porção total da raiz (principal e secundárias) para análise de PCR em tempo real.

5.3.5.2 Expressão gênica por PCR em tempo real

As amostras coletadas de folha e raiz foram maceradas em nitrogênio líquido para extração de RNA utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após essa etapa foi realizado o tratamento das amostras para remoção de DNA contaminante utilizando a enzima DNase I (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo do fabricante, utilizando o RNA tratado de qualidade foi sintetizado o cDNA utilizando SuperScript III First Strand Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) seguindo protocolo do fabricante. O cDNA de alta qualidade foi utilizado para analisar os transcritos em cada tratamento.

As amplificações RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) em um termociclador 7300 RT-qPCR (Applied Biosystems/Life Technologies, Grand Island, New York, EUA) com os seguintes parâmetros de ciclagem: 50°C por 2 min; 95°C durante 10 min; e 45 ciclos de 95°C durante 2 min, 60°C durante 30 s e 72°C durante 30s. As curvas padrões foram produzidas a partir de diluições seriadas de um pool de cDNA para estimar a eficiência da amplificação por PCR com cada par de *primers*. As concentrações dos *primers* foram ajustadas para atingir taxas de eficiência superiores a 90%. Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas.

O desenho dos *primers* foi feito com o auxílio da ferramenta Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2012), seguindo os genes selecionados previamente com os parâmetros adequados para o RTq-PCR (Tabela 2). Os primers do Glyma.15G050200 (β -actina) de soja foi utilizado como endógeno em situação de encharcamento (NAKAYAMA *et al.*, 2017) e o primer do Glyma.13G114700 (FYVE zinc finger) de soja foi utilizado para a situação de seca (MARCOLINO-GOMES *et*

al., 2015). Os dados foram rodados no Software Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

Tabela 5.2 – Design de *Primers* para RTq-PCR. Identificação, sequências de *primers* e eficiência de amplificação.

| Identificação (ID) | Primer Forward | Primer Reverse | Eficiência (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Glyma.11G121700.1 | 5'-TGTAGCAGCTGAGCATTTCG-3' | 5'-TGTAGCAGCTGAGCATTTCG-3' | 91.3 |
| Glyma.11G121800.1 | 5'-GCATGGGGAGAAGCTTATGA-3' | 5'-AATGCGAAACACTTCCCAAC-3' | 98.7 |
| Glyma.20G191200.1 | 5'-AGTTGGGGACAAATGGAGTG-3' | 5'-CACTTGACGGCAATAGTAGATCC-3' | 90.1 |
| Glyma.13G114700 (FYVE) | 5'- TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG-3' | 5'- GATCCCTCATCCATACATTTTCAG-3' | 98.4 |
| Glyma.15G050200 (β -actina) | 5'- GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3' | 5'- CGTTTCATGAATTCCAGTAGC-3' | 97.9 |
| Glyma.17G164200 (LEA18) | 5'- AAAGGCACAGAGTGATGAAT-3' | 5'-CTTGATGACCTTGTGTACCA-3' | 90.0 |
| Glyma.04G240800 (ADH) | 5'-CCTGTGAGGGACTGAGTTCTCTTTC-3' | 5'-ACAGCAGCAAAGGTCCTATCATTCT-3' | 90.0 |

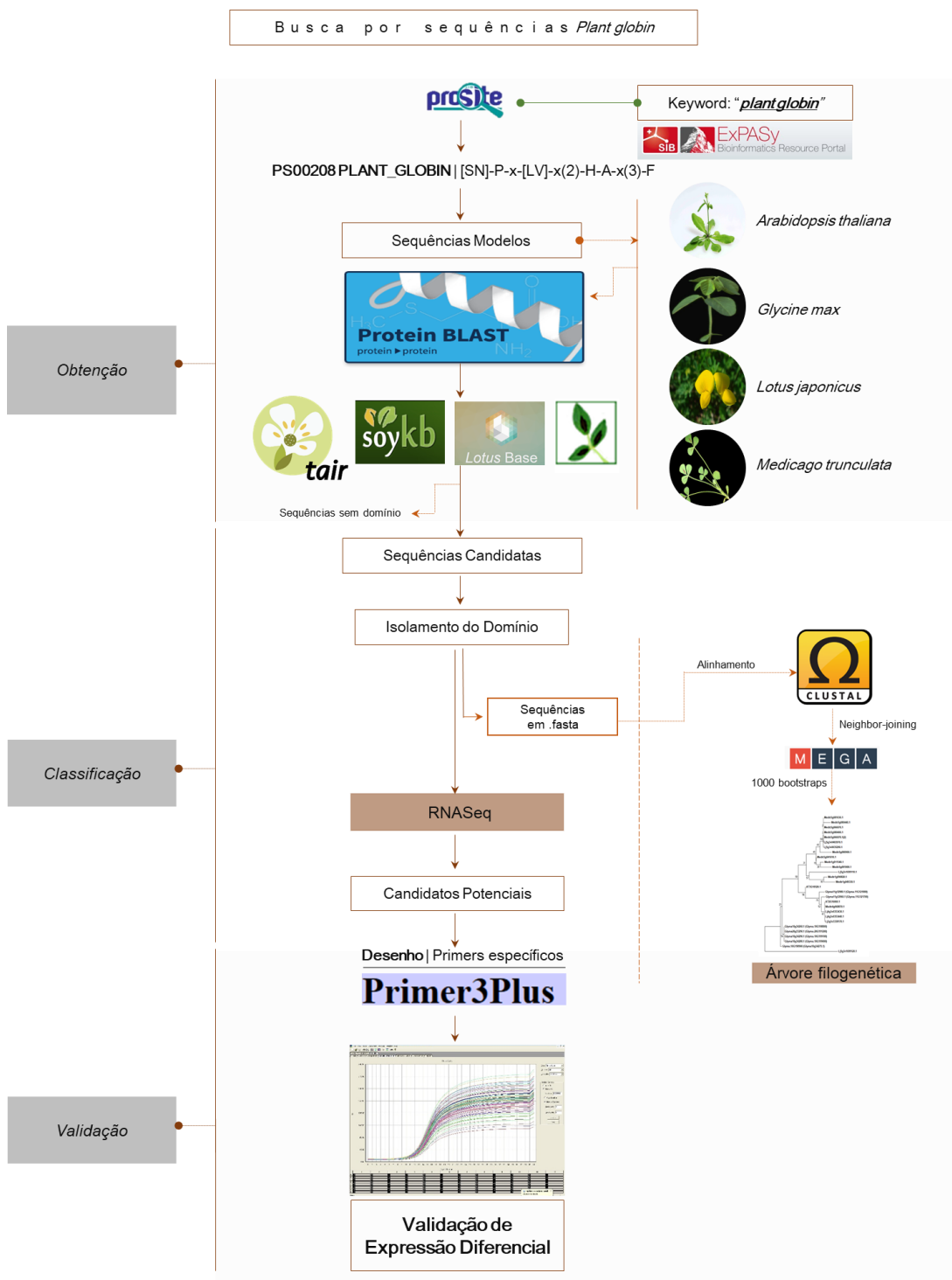
Fonte: Próprio autor.

Após a realização da análise de eficiência dos *primers*, os níveis de expressão dos genes *nsHb*, foram analisados. A expressão dos genes alvo foi normalizada utilizando os genes endógeno Glyma.15G050200 (*β -actina*) mostrou adequado para uso como endógeno em situação de encharcamento (NAKAYAMA *et al.*, 2017) e Glyma.13G114700 (*FYVE zinc finger*) de soja o qual foi analisado previamente como um endógeno previamente caracterizado como adequado para situações de seca (MARCOLINO-GOMES *et al.*, 2015).

Com propósito de confirmar a indução do estresse nos diferentes tratamentos, adicionalmente, avaliou-se a expressão dos genes Glyma.04G240800 (*Alcohol dehydrogenase, class III/ADH*), o qual é altamente expresso na condição de encharcamento (NAKAYAMA *et al.*, 2017), por estar associado a rotas de fermentação (KOMATSU; THIBAUT; HIRAGA, 2011), e o gene Glyma.17G164200 (*Late embryogenesis abundant/LEA18*), o qual é altamente expresso na condição de seca (ASAKURA *et al.*, 2012; FUGANTI-PAGLIARINI *et al.*, 2017). A expressão relativa foi calibrada a partir das amostras da cultivar BR16 cultivadas sob a condição controle. A análise da expressão gênica foi realizada usando o pacote de Software Rest2009 versão 2.0.13 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

Para melhor compreensão, as etapas realizadas estão detalhadas em um fluxograma, disposto abaixo (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Fluxograma das atividades realizadas, caracterizado em: Obtenção das sequências que continham o domínio *Plant Globin* em bancos de dados específicos, classificação das sequências pela elaboração de uma árvore filogenética e por busca em bancos de RNA-seq e a validação dos dados obtidos por RTq-PCR.



Fonte: Próprio autor.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Árvore Filogenética

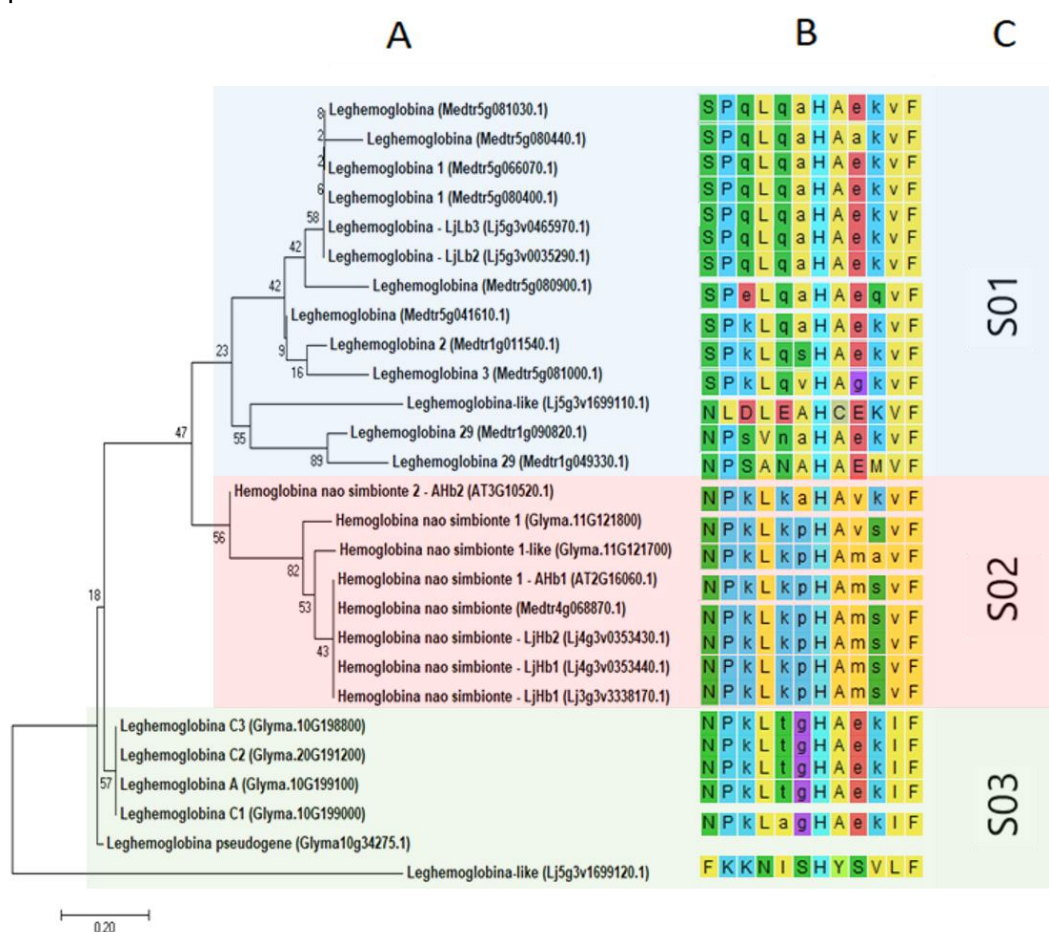
Um total de 70 sequências, anotadas como *Plant globin*, foram obtidas nos quatro bancos de dados públicos consultados, por meio de busca através dos domínios característicos de hemoglobina descritos para cada espécie e por meio de busca adicional através da palavra chave “*Plant globin*”. Foram identificadas como 26 sequências candidatas em *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), sete sequências candidatas de soja, 17 sequências candidatas de *Lotus japonicus* e 20 sequências candidatas de *Medicago trunculata*. Após eliminar as sequências redundantes e confirmar a presença do domínio do domínio “*Plant Globin*” no banco de dados Prosite, foram confirmadas 27 sequências de hemoglobinas, sendo duas em arabidopsis, sete em soja, sete em *Lotus japonicus* e 11 em *Medicago trunculata*. (Apêndice A).

A partir da construção da árvore filogenética (Figura 5.2), considerou-se a formação de três subgrupos principais. O subgrupo S01, contendo majoritariamente sequências de leghemoglobina de *Medicago trunculata* e *Lotus japonicus*. O subgrupo S02 que agrupou todas as sequências consideradas hemoglobinas não simbiotes, de todas as espécies estudadas nesse trabalho. Cabe destacar que as duas sequências de *nsHb-1* de soja diferem apenas por um aminoácido, sendo o gene Glyma.11G121800.1 possui uma serina e o gene Glyma.11G121700.1 possui no mesmo local uma alanina. Por fim, o subgrupo S03 foi composto somente por leghemoglobinas de soja, e a sequência Lj5g3v1699120.1, a qual foi considerada mais divergente das outras sequências.

A partir da sequência consenso do domínio estabelecida no MEME (Figura 5.3), foi possível observar a alta similaridade entre as sequências, principalmente entre aquelas estabelecidas em um mesmo subgrupo. Deste modo, é possível inferir que possivelmente toda sequência classificada em um mesmo grupo pode potencialmente desempenhar um papel similar. A classificação e organização da árvore filogenética do presente trabalho poderão ser utilizadas como um guia em

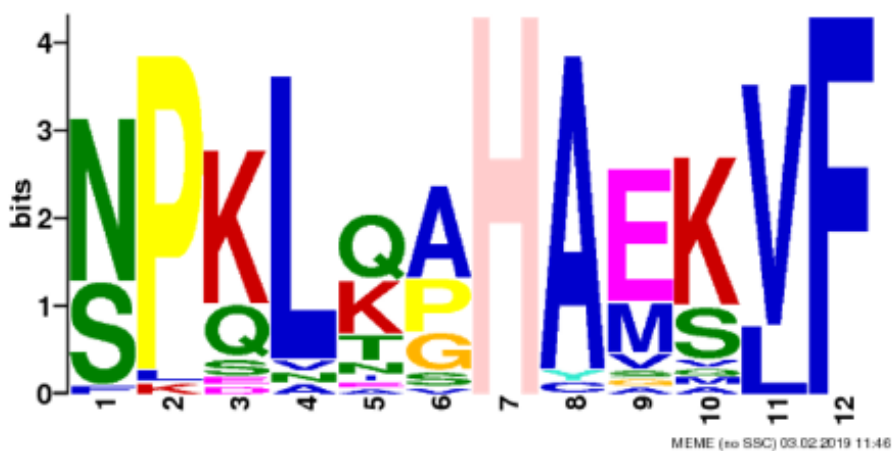
futuros trabalhos para classificar novas sequências de *plant globin* e indicar funções putativas. É possível constatar que a sequência mais distante é a de *Lotus japonicus* Lj5g3v1699120.1, e que entre os subgrupos a divergência entre os aminoácidos foi de 1-3 aminoácidos.

Figura 5.2 – Árvore filogenética que demonstra a relação entre as sequências de leghemoglobina e hemoglobina não simbiote selecionadas A) árvore filogenética obtida através do MEGA; B) Alinhamento dos motivos obtidos no MEME; C) identificação dos subgrupos.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.3 – Sequência consenso do domínio de *Plant globin* em soja, *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus* e *Medicago trunculata*.



| Name | Start | p-value | Sites |
|-----------------------------------|-------|----------|--------------|
| Glyma10g34280.1_(Glyma.10G199000) | 1 | 9.16e-13 | NPKLTGHAEKLF |
| Glyma10g34290.1_(Glyma.10G199100) | 1 | 9.16e-13 | NPKLTGHAEKLF |
| Glyma20g33290.1_(Glyma.20G191200) | 1 | 9.16e-13 | NPKLTGHAEKLF |
| Glyma10g34260.1_(Glyma.10G198800) | 1 | 9.16e-13 | NPKLTGHAEKLF |
| Medtr5g041610.1 | 1 | 5.10e-12 | SPKLQAHAEKVF |
| Lj5g3v0035290.1 | 1 | 6.10e-12 | SPQLQAHAEKVF |
| Lj5g3v0465970.1 | 1 | 6.10e-12 | SPQLQAHAEKVF |
| Medtr5g080400.1 | 1 | 6.10e-12 | SPQLQAHAEKVF |
| Medtr5g081030.1 | 1 | 6.10e-12 | SPQLQAHAEKVF |
| Medtr5g066070.1 | 1 | 6.10e-12 | SPQLQAHAEKVF |
| Medtr1g011540.1 | 1 | 1.90e-11 | SPKLQSHAEKVF |
| Lj3g3v3338170.1 | 1 | 2.66e-11 | NPKLKPHAMSVF |
| Lj4g3v0353440.1 | 1 | 2.66e-11 | NPKLKPHAMSVF |
| Lj4g3v0353430.1 | 1 | 2.66e-11 | NPKLKPHAMSVF |
| Medtr4g068870.1 | 1 | 2.66e-11 | NPKLKPHAMSVF |
| AT2G16060.1 | 1 | 2.66e-11 | NPKLKPHAMSVF |
| Glyma.10G198900 | 1 | 9.00e-11 | NPKLAGHAEKLF |
| AT3G10520.1 | 1 | 1.62e-10 | NPKLKAVKVF |
| Lj5g3v1699110.1 | 1 | 1.86e-10 | NLDLEACEKVF |
| Medtr5g080900.1 | 1 | 2.13e-10 | SPQLQAHAEQVF |
| Medtr5g080440.1 | 1 | 2.77e-10 | SPQLQAHAAKVF |
| Glyma11g12960.1_(Glyma.11G121700) | 1 | 2.77e-10 | NPKLKPHAMAVF |
| Medtr5g081000.1 | 1 | 3.15e-10 | SPKLQVHAGKVF |
| Glyma11g12980.1_(Glyma.11G121800) | 1 | 3.15e-10 | NPKLKPHAVSVF |
| Medtr1g090820.1 | 1 | 1.65e-9 | NPSVNAHAEKVF |
| Medtr1g049330.1 | 1 | 8.10e-9 | NPSANAHAEKVF |
| Lj5g3v1699120.1 | 1 | 2.42e-6 | FKKNISHYSVLF |

Fonte: Próprio autor.

5.4.2 Análise dos Bancos de RNA-Seq

Conforme observado nos dados da Tabela 5.3, foi possível constatar que na condição de hipóxia três genes foram diferencialmente expressos, sendo esses Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1 e Glyma.20G191200.1. Porém, houve uma maior indução de dois genes: Glyma.11G121700.1 e Glyma.11G121800.1. A expressão variou em função do tempo de duração do estresse e também em função do genótipo.

Na biblioteca de hipóxia (Tabela 5.3) o gene Glyma.11G121700.1 apresentou maior expressão nos tempos de 4 horas em ambos genótipos, com *fold-change* de 19.20 na BR4 e 26.34 na Embrapa 45. O gene Glyma.11G121800.1 apresentou maior expressão que os outros genes, sendo os maiores níveis na BR4 em 4 horas com *fold-change* de 67.97 e em 28 horas obteve-se o valor de 23.11, já no genótipo Embrapa 45 o maior nível de expressão foi em 4 horas com *fold-change* de 99.86, sendo esse nível maior que na BR4. O gene Glyma.20G191200.1 apresentou somente uma diminuição significativa de sua expressão na Embrapa 45 em 4 horas com *fold-change* de 13.83, sendo *down-regulado*.

Na biblioteca de seca (Tabela 5.4) o gene Glyma.11G121700.1 apresentou expressão na raiz do genótipo Embrapa 48 em todos os tempos, sendo os valores *up regulados* com *fold-change* de 6.60, 8.75 e 5.40 para os tempos respectivamente, já na cultivar sensível, os valores de expressão foram menores. O gene Glyma.11G121800.1 não apresentou expressão em nenhum dos tecidos. O gene Glyma.20G191200.1 foi detectado em ambos os tecidos, porém, não houve indução da expressão desse gene em função do estresse quando comparado ao controle, resultado igual ao observado para os demais genes.

Tabela 5.3 – Dados de expressão de genes codificadores de hemoglobinas em soja. Dados provenientes de bibliotecas de RNA-seq de raiz de soja sob hipóxia por diferentes períodos de exposição ao estresse, em duas cultivares BR 4 (sensível) e Embrapa 45 (moderadamente tolerante). A: 0,5 horas; B: 4 horas; C: 28 horas de hipóxia. Valores expressos em *Fold-Change*. Genes diferencialmente expressos: *fold-change* ≥ 2 (*up*), ≤ -2 (*down*); adj. $p \leq 0,01$; RPM ≥ 9 (conjuntos de dados de controle ou de estresse).

| Genótipo/ Tratamento | Identificação (SoyKB) | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Glyma.11G121700.1 | Glyma.11G121800.1 | Glyma.20G191200.1 | Glyma.10G199100.1 | Glyma.10G198800.1 | Glyma.10G199000.1 | Glyma.10G198900.1 |
| | Expressão (<i>Fold-Change</i>) | | | | | | |
| BR4 A | 1,36 | 3,2 | -1,25 | -1,25 | -1,25 | -1,25 | -1,25 |
| BR4 B | 19,2 | 67,97 | -1,11 | -1,11 | -1,11 | -1,11 | -1,11 |
| BR4 C | 7,31 | 23,11 | -1,81 | -1,81 | -1,81 | -1,81 | -1,81 |
| Embrapa 45 A | 3,66 | 4,58 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| Embrapa 45 B | 26,34 | 99,86 | -13,73 | -1,49 | -1,49 | -1,49 | -1,49 |
| Embrapa 45 C | 2,89 | 8,99 | -1,01 | -1,01 | -1,01 | -1,01 | -1,01 |

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.4 – Dados de expressão de genes codificadores de hemoglobinas em soja. Dados provenientes de bibliotecas de RNA-seq de folha e raiz soja sob seca por diferentes períodos de exposição ao estresse, em duas cultivares BR16 (sensível) e Embrapa 48 (moderadamente tolerante). A: 25 a 50 minutos; B: 75 a 100 minutos; C: 125 a 150 minutos. Valores expressos em *Fold-Change*. Genes diferencialmente expressos: *fold-change* ≥ 2 (*up*), ≤ -2 (*down*); adj. $p \leq 0,01$; RPM ≥ 9 (conjuntos de dados de controle ou de estresse).

| Genótipo/ Tratamento | Identificação (SoyKB) | | | | | | | Expressão (<i>Fold-Change</i>) | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| | Glyma.11G121700.1 | Glyma.11G121800.1 | Glyma.20G191200.1 | Glyma.10G199100.1 | Glyma.10G198800.1 | Glyma.10G199000.1 | Glyma.10G198900.1 | Folha | Raiz | Folha | Raiz | Folha | Raiz | Folha |
| BR16 A | na | -1,64 | na | na | -1,11 | 1,22 | -1,11 | 1,22 | -1,11 | 1,22 | -1,11 | 1,22 | na | na |
| BR16 B | na | 3,44 | na | na | -1,35 | 1,37 | -1,35 | 1,37 | -1,35 | 1,37 | -1,35 | 1,37 | na | na |
| BR16 C | na | 3,3 | na | na | -1,39 | 1,1 | -1,39 | 1,1 | -1,39 | 1,1 | -1,39 | 1,1 | na | na |
| Embrapa 48 A | na | 6,6 | na | na | 1,06 | 1,32 | 1,06 | 1,32 | 1,06 | 1,32 | 1,06 | 1,32 | na | na |
| Embrapa 48 B | na | 8,75 | na | na | -1,04 | 1,75 | -1,04 | 1,75 | -1,04 | 1,75 | -1,04 | 1,75 | na | na |
| Embrapa 48 C | Na | 5,4 | na | na | 1,12 | 1,35 | 1,12 | 1,35 | 1,12 | 1,35 | 1,12 | 1,35 | na | na |

Fonte: Próprio autor.

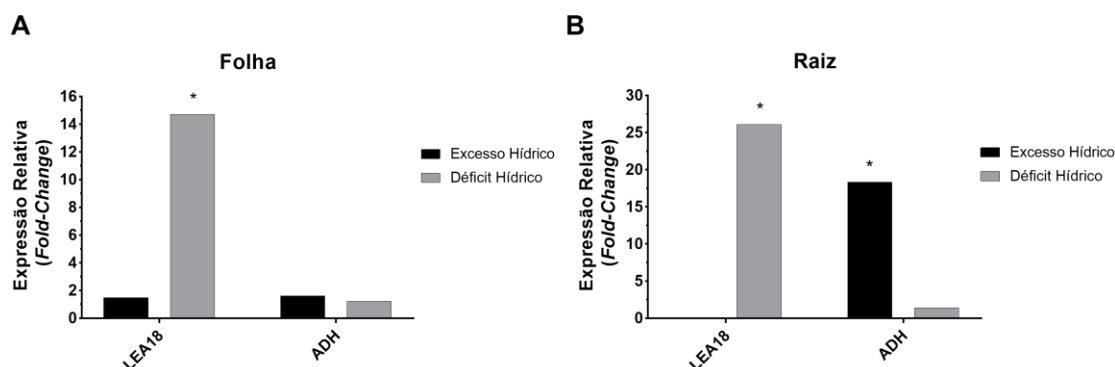
5.4.3 Validação dos Resultados de RNA-Seq por PCR em Tempo Real

Para a caracterização da expressão dos genes selecionados (Tabela 5.1) foram utilizados os tecidos de raiz e folha de BR16 nas condições de seca e encharcamento, sendo a condição controle utilizada como calibrador. Inicialmente confirmou-se a eficiência da indução do estresse por meio da avaliação de genes estresse responsivos, tanto para o encharcamento (*ADH*) como a seca (*LEA18*). O gene Glyma.17G164200 que codifica a LEA18 (proteínas abundantes na embriogênese tardia/LEA18) apresentou alta expressão sob seca, tanto no tecido de folha como em raiz (Figura 5.4A e Figura 5.4B). Já para o gene Glyma.04G240800 que codifica para ADH, maior nível de expressão foi observado na raiz sob encharcamento (Figura 5.4B).

Com relação aos genes codificadores das hemoglobinas (Figura 5.5A e Figura 5.5B) na condição de encharcamento, foi significativa a alteração na expressão dos genes Glyma.11G121700.1 e o Glyma.11G121800.1, sendo que os resultados variaram conforme o tecido. Nas folhas (Figura 5.5A), esses genes apareceram como *down* regulados enquanto nas raízes (Figura 5.5B), ambos os genes foram *up* regulados. A maior expressão foi observada para o Glyma.11G121800.1, com aumento de mais de 16,61 vezes em relação ao tratamento controle.

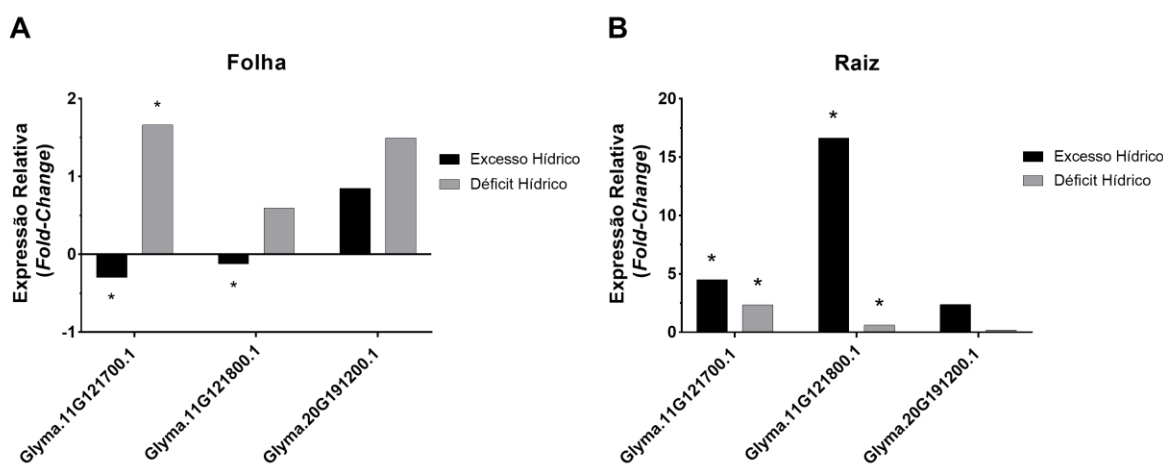
Já em condição de seca, os resultados foram significativos, sendo *up* regulados para o gene Glyma.11G121700.1 em folhas (Figura 5.5A) e raízes (Figura 5.5B) e para o gene Glyma.11G121800.1 apenas em raízes. O gene Glyma.20G191200.1 não foi significativo em nenhuma das condições ou tecidos testados.

Figura 5.4 – Expressão relativa (*fold-change*) dos genes LEA18 e ADH por RTq-PCR em soja. Expressão dos genes Glyma.17G164200 (LEA18) e Glyma.04G240800 (ADH) em plantas de soja da cultivar BR16 submetidas às condições de estresse por encharcamento e seca em tecido de folha (A) e raiz (B). A calibração foi realizada pelas plantas na condição controle. * Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.5 – Expressão relativa (*fold-change*) dos genes de hemoglobina não simbiótica por RTq-PCR em soja. A expressão de Glyma.11G121700.1, Glyma.11G121800.1 e Glyma.20G191200.1 em plantas de soja da cultivar BR16 submetidas às condições de estresse por encharcamento e seca em tecido de folha (A) e raiz (B). A calibração foi realizada pelas plantas na condição controle. * Indicam resultados significativos $p < 0.05$, conforme calculado por Rest2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).



Fonte: Próprio autor.

5.5 DISCUSSÃO

Para esclarecer a relação entre o gene *nsHb-1* de soja com outras sequências de hemoglobinas foi gerada uma árvore filogenética (Figura 5.2). Apesar da revisão de Garrocho-Villegas, Gopalasubramaniam e Arredondo-Peter (2007) trazer em uma árvore filogenética com informações que foram observadas até a última década, sobre as classes de hemoglobinas e seus aspectos evolutivos, em várias espécies de plantas. Entretanto, pouco foi efetivamente explorado quando se trata de leguminosas.

A análise das sequências obtidas na ferramenta Prosite, combinada com inspeção manual após alinhamento no MEGA, permitiu a identificação de um total de 27 sequências contendo o domínio *Plant globin* nas espécies analisadas no presente estudo. Trabalhos anteriores já apontaram a presença da sequência de nsHb em soja (ANDERSSON *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (TREVASKIS *et al.*, 1997; WATTS *et al.*, 2001), *Medicago trunculata* (SEREGÉLYE *et al.*, 2000) e *Lotus Japonicus* (SATO *et al.*, 2001; UCHIUMI *et al.*, 2002), entretanto esses estudos não apresentavam uma caracterização detalhada desses genes.

Neste trabalho todas as sequências de nsHb foram agrupadas no subgrupo S02, demonstrando sua semelhança, o que corrobora com estudos prévios como o de Arredondo-Peter *et al.* (1998) e de Strozycki, Karlowski e Dessaux (2000), os quais relataram a proximidade da AHb1 (hemoglobina não simbiote de *Arabidopsis*) com a nsHb-1 de soja.

O subgrupo S01 e S03, para leghemoglobinas de *Medicago trunculata*, *Lotus japonicus* e soja, respectivamente, são semelhantes ao encontrado no trabalho de Kawashima *et al.* (2001), no qual foram classificadas as leghemoglobinas. As leghemoglobinas são evolutivamente diferentes das nsHbs, e podem ser diferenciadas através de suas funções distintas (GUPTA *et al.*, 2011). No estudo de Riquelme e Hinrichsen (2015), também observou-se formação de diferentes subgrupos entre as leghemoglobinas e as nsHbs.

A partir dos resultados da sequência consenso do MEME (Figura 5.3), é possível afirmar que as sequências de soja, Glyma.11G121700.1 e

Glyma.11G121800.1, possuem a função de nsHb-1, visto que seu agrupamento se deu com genes de outras espécies que possuem essa mesma classificação. Adicionalmente, os resultados mostram que as sequências desses dois genes de soja diferem em apenas um aminoácido. A sequência que apresentou maior diferença nesse subgrupo é caracterizada como uma hemoglobina não simbiote de classe 2 de *A. thaliana*, sendo que essa classe age como um transportador de oxigênio e não é induzida em situações de baixa concentração de O₂ (SPYRAKIS *et al.*, 2011).

Os genes de soja identificados por meio das ferramentas de bioinformática tiveram sua expressão avaliada a partir de bibliotecas de RNA-seq de soja sob hipóxia, simulando encharcamento e seca. Embora todos os genes tenham sido encontrados nas bibliotecas estudadas, apenas os genes classificados como *nsHb* e um gene da leghemoglobina apresentaram expressão diferencial nas condições de estresse.

Nas bibliotecas de hipóxia, o gene *nsHb-1* Glyma.11G121800.1, apresentou-se significativamente *up* regulado, concordando com estudos prévios realizados por Nakayama *et al.* (2017), que já relatavam a alta associação desse gene com as respostas a hipóxia em soja. O segundo gene classificado no presente estudo como *nsHb-1*, Glyma.11G121700.1, anotado como uma hemoglobina não simbiote de classe 1-like, também teve uma alteração importante, principalmente na cultivar Embrapa 45, considerada moderadamente tolerante ao estresse, chegando a um aumento aproximado de 9 vezes nos valores de expressão no tratamento hipóxia em comparação ao controle.

Já o gene Glyma.20G191200.1, classificado como leghemoglobina, foi alterado em apenas um dos tratamentos testados (Embrapa 45 – 4 horas), sendo *down* regulado. A fixação de nitrogênio nas plantas é significativamente afetada pelo encharcamento ou por exposição das raízes a uma atmosfera com baixa concentração de O₂ (hipóxia) (WITTY *et al.*, 1987), pois esse evento ocorre através da simbiose entre leguminosas e rizóbios, (DAKORA; ATKINS, 1991), sendo necessária a presença de O₂ para que ocorra a respiração que gera a energia que será utilizada na FBN (AMARANTE; SODEK, 2006). A concentração de O₂ dentro

dos nódulos é controlada pela planta graças a uma barreira à difusão do O₂ (MINCHIN, 1997) e pela presença da leghemoglobina, uma nodulina encontrada em altas concentrações no citoplasma de células de nódulos (APPLEBY, 1984). A leghemoglobina tem papel crucial neste processo, pois atua ao ligar-se ao oxigênio (APPLEBY, 1984; LUCIŃSKI; POLCYN; RATAJCZAK, 2002), sendo assim, a *down* regulação do Glyma.20G191200.1 (Tabela 5.4) pode se dar pelo fato de que durante o encharcamento há baixa concentração de oxigênio sendo difundido nos tecidos, não havendo pretexto para expressão da proteína.

Os genes que apresentaram expressão diferencial nas bibliotecas de RNA-seq foram validados por PCR em tempo real, em um ensaio conduzido com soja, sob os estresses de encharcamento e seca. Os dados da validação por meio de PCR em tempo real corroboram com os resultados das bibliotecas de RNA-seq. Em condição de encharcamento comparado a condição controle, observou-se que o Glyma.11G121800.1 foi fortemente expresso nas raízes submetidas ao estresse. Esse gene classificado como uma nsHb-1 foi mais fortemente induzido sob encharcamento, com expressão 16,61 vezes maior que o controle, seguido pelo Glyma.11G121700.1, o qual foi expresso 4,513 vezes mais que o controle. Já para o Glyma.20G191200.1 não houve diferença em relação ao controle.

Na folha, o padrão de expressão desses genes em condição de estresse por encharcamento diferiu do observado em raízes, sendo que ambos os genes, Glyma.11G121700.1 e Glyma.11G121800.1, foram levemente *down* regulados, enquanto que o gene Glyma.20G191200.1 não apresentou diferença significativa em comparação ao controle. A maior presença desses genes na raiz é explicada pelo fato de que os estresses abióticos relacionados com a disponibilidade hídrica do solo afetam principalmente raízes (DAVIES; WILKINSON; LOVEYS, 2002; WILKINSON; DAVIES, 2002), particularmente o estresse por encharcamento (OH; KOMATSU, 2015). O qual promove a ativação de mecanismos associados a hipóxia, como iniciar rotas fermentativas para obtenção de energia (BORELLA *et al.*, 2014), redução da permeabilidade da raiz, a absorção de água e absorção mineral, seguida pela diminuição da fotossíntese (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). Sob estresse de encharcamento, aumento dos níveis de nsHb-1 melhoram o estado redox e energia

(IGAMBERDIEV *et al.*, 2005), eliminando NO (DORDAS; RIVOAL; HILL, 2003; PERAZZOLLI *et al.*, 2004) e regenerando NAD(P)⁺ (DORDAS *et al.*, 2003).

Já na biblioteca de seca, nos dados de RNA-seq não foram observadas diferenças de expressão dos genes no tecido de folha. Nas raízes o gene Glyma.11G121700.1, foi induzido pelo estresse principalmente na cultivar considerada como mais tolerante. Nos dados de PCR em tempo real sob seca, o Glyma.11G121700.1 também foi o que apresentou melhor desempenho, sendo *up* regulado em folhas, expressando 1,66 vezes mais que o controle e em raízes, onde apresentou 2,35 vezes maior expressão em relação ao controle.

Dessa forma, os resultados combinados das bibliotecas de RNA-seq e de PCR em tempo real mostram que o gene Glyma.11G121800.1 destaca-se na condição de encharcamento, enquanto que o Glyma.11G121700.1 foi o que apresentou maior alteração na expressão sob condição de seca. Esses resultados divergentes entre os dois genes, apesar de serem do mesmo subgrupo (S02) na árvore filogenética, podem ser explicados pela diferença de um aminoácido na sequência do domínio (Figura 5.2 e Figura 5.3).

Os resultado para os dois genes de *nsHb-1* de soja diferem do que acontece com as demais leghemoglobinas, como no caso a que foi estudada Glyma.20G191200.1, que não alterou o padrão de expressão em resposta ao estresse, e igualmente demonstrou baixos níveis de expressão nas bibliotecas de RNA-seq. Esse resultado corrobora com a disposição desse gene na árvore filogenética, visto que ele não é pertencente ao mesmo subgrupo das nsHbs (Figura 5.2). As leghemoglobinas estão associadas a outras funções como fixação de nitrogênio (BECANA *et al.*, 1994), sendo produzida na planta através de uma associação simbiótica da planta com bactérias (SINGH; VARMA, 2017). Durante o processo de fixação biológica de nitrogênio a enzima nitrogenase metaloenzima, responsável pela conversão de nitrogênio (N₂) para amônio (NH₄), não pode ser exposta ao oxigênio, pois a mesma é inativada. No entanto, as bactérias requerem oxigênio para a respiração, o qual é fornecido pelas leghemoglobina (BECANA; KLUCAS, 1992).

Os resultados obtidos contribuem para um melhor entendimento da caracterização da resposta dos genes *nsHb-1* em soja durante o encharcamento e a seca nos tecidos de folha e raiz, visto que os dados sobre esses genes em soja são escassos. Esses dados também podem auxiliar em pesquisas futuras de engenharia genética para a obtenção de plantas tolerantes aos estresses abióticos.

5.6 CONCLUSÕES

Nesse estudo foram identificados sete genes de hemoglobina em soja, sendo dois classificados como *nsHb-1* e cinco classificados como leghemoglobinas.

Observou-se uma alta conservação entre os genes de *nsHb-1* de soja com as demais espécies (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata* e *Lotus Japonicus*) investigadas nesse estudo

Ambos os genes da *nsHb-1* de soja identificados estão estreitamente relacionados estresses abióticos, mostrando que o Glyma.11G121800.1 é mais expresso no estresse por encharcamento e Glyma.11G121700.1 é expresso em ambas condições de estresse, sendo mais significativo na seca.

Apesar da semelhança do Glyma.20G191200.1 com os demais, o mesmo caracteriza-se como uma leghemoglobina, apresentando um perfil de expressão que não foi induzido pelos estresses de encharcamento e seca.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que o evento *AtAREB1* 1Ea2939 apresentou desempenho superior em comparação ao *background* convencional sob condição de encharcamento, apresentando resultados superiores nas variáveis fisiológicas, mantendo sob estresse maior fotossíntese, maior eficiência intrínseca no uso da água e maior eficiência intrínseca de carboxilação em comparação a cultivar convencional e sugerindo um controle mais eficiente no balanço das ROS. Nas avaliações moleculares de expressão, a linhagem GM apresentou menor ativação de genes do metabolismo fermentativo e da produção de alanina, sugerindo que nessa linhagem o estresse ocorreu de forma menos intensa. Além de apresentar uma recuperação eficiente após o estresse, permitindo que se recuperasse completamente até o reprodutivo.

Esses resultados contribuem para caracterização do gene *AtAREB1* como um TF que pode atuar em vias de sinalização cruzada, contribuindo para a tolerância aos estresses por encharcamento e seca.

Através da busca em banco de dados, dados de RNA-seq e RTq-PCR caracterizou-se os genes da hemoglobina não simbiote de classe 1 de soja. O gene Glyma.11G121800.1 foi mais expresso na condição de encharcamento, sendo expresso 16,61 vezes mais que a situação controle, enquanto o gene Glyma.11G121700.1 foi expresso 4,513 vezes mais nas raízes durante o estresse por encharcamento e 1,66 vezes mais na folha e 2,35 vezes mais na raiz no estresse por seca. Já para o Glyma.20G191200.1 não houve diferença em relação ao controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 15, n. January, p. 63–78, 2003.

AHMED, S.; HASAN, M. Legumes: an overview. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 2, n. 1, p. 34-38, 2014.

AKMAN, M.; BHIKHARIE, A. V.; MCLEAN, E. H.; BOONMAN, A.; VISSER, E. J. W.; SCHRANZ, M. E.; VAN TIENDEREN, P. H. Wait or escape? Contrasting submergence tolerance strategies of *Rorippa amphibia*, *Rorippa sylvestris* and their hybrid. **Annals of Botany**, v. 109, n. 7, p. 1263–1275, 2012.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALMADA, R.; ARISMENDI, M. J.; PIMENTEL, P.; ROJAS, P.; HINRICHSEN, P.; PINTO, M.; SAGREDO, B. Class 1 non-symbiotic and class 3 truncated hemoglobin-like genes are differentially expressed in stone fruit rootstocks (*Prunus* L.) with different degrees of tolerance to root hypoxia. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, n. 4, p. 1051–1063, 2013.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 2002.

AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University - Science**, p. 1–32, 2011.

AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 3, p. 405–410, 2006.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings. **Plant physiology**, v. 109, n. 4, p. 1247–1257, 1995.

ANDERSSON, C. R.; JENSEN, E. O.; LLEWELLYN, D. J.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, A. W. J. A new hemoglobin gene from soybean: A role for hemoglobin in all plants (nonsymbiotic/leghemoglobin/evolution). **Plant Biology**, v. 93, n. June, p. 5682–5687, 1996.

APPLEBY, C. A. Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, n. 1, p. 443–478, 1984. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.35.060184.002303>

ARC, E.; GALLAND, M.; GODIN, B.; CUEFF, G.; RAJJOU, L. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. September, p. 1–13, 2013.

ARREDONDO-PETER, R.; HARGROVE, M.S.; MORAN, J.F.; SARATH, G.; KLUCAS, R.V. Plant Hemoglobins. **Plant Physiology**. v. 118, n. 4, p. 1121-1125. 1998.

ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M. B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, n. 4, p. 307–358, 1994.

ASAKURA, T.; TAMURA, T.; TERAUCHI, K.; NARIKAWA, T.; YAGASAKI, K.; ISHIMARU, Y.; ABE, K. Plant Physiology and Biochemistry Global gene expression profiles in developing soybean seeds. **Plant Physiology e Biochemistry**, v. 52, p. 147–153, 2012.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280–292, 1998.

AZOOZ, M. M.; AHMADM, P. **Plant-Environment Interaction: Responses and Approaches to Mitigate Stress**. Inglaterra: Wiley-Blackwell, 2016. 368 p.

BAI, X.; LONG, J.; HE, X.; YAN, J.; CHEN, X.; TAN, Y.; LI, K.; CHEN, L.; XU, H. Overexpression of spinach non-symbiotic hemoglobin in Arabidopsis resulted in decreased NO content and lowered nitrate and other abiotic stresses tolerance. **Scientific reports**, v. 6, n. May, p. 26400, 2016.

BAILEY-SERRES, J.; LEE, S. C.; BRINTON, E. Waterproofing Crops: Effective Flooding Survival Strategies. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1698–1709, 2012.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 313–339, 2008.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 5, p. 489–494, 2010.

BANTI, V.; GIUNTOLI, B.; GONZALI, S.; LORETI, E.; MAGNESCHI, L.; NOVI, G.; PAPARELLI, E.; PARLANTI, S.; PUCCIARIELLO, C.; SANTANIELLO, A.; PERATA, P. Low oxygen response mechanisms in green organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4734–4761, 2013.

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; DE FÁTIMA CORRÊA CARVALHO, J.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; MARUYAMA, K.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the ABA-Dependent AREB1 Transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* Improves Soybean Tolerance to Water Deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 719–730, 2012.

BECANA, M.; KLUCAS, R. V. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. **Plant physiology**, v. 98, n. 4, p. 1217–1221, 1992.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I.; GOGORCENA, Y.; ESCUREDO, P.R. Structure and function of leghemoglobins. **An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza)**, v. 21, n.3, p. 203-208, 1994

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 51, n. 1, p. 289–300, 1995.

BLANKE, M. M.; COOKE, D. T. Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 153–160, 2004.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 359–373, 2010.

BORELLA, J.; BECKER, R.; LIMA, M. C.; DE OLIVEIRA, D. S. C.; BRAGA, E. J. B.; DE OLIVEIRA, A. C. B.; DO AMARANTE, L. Nitrogen source influences the antioxidative system of soybean plants under hypoxia and re-oxygenation. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 1, p. 51–62, 2017.

BORELLA, J.; DO AMARANTE, L.; DE OLIVEIRA, D. S. C.; DE OLIVEIRA, A. C. B.; BRAGA, E. J. B. Waterlogging-induced changes in fermentative metabolism in roots and nodules of soybean genotypes. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 6, p. 499–508, nov-dec. 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: GRUISSEM, W.; BUCHANNAN, B.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 2000. p 1158–124

BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**. São Paulo:UNESP. 2014. 92p.

CASAGRANDE, E. C.; RENATO, J.; FARIAS, B.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; LIMA, A. Seca Em Soja Differential Gene Expression in Soybean During Water Deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 168–184, 2001.

CAUDLE, K. L.; MARICLE, B. R. Effects of Flooding on Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence, and Oxygen Stress in Plants of Varying Flooding Tolerance. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 115, n. 1 & 2, p. 5–18, 2012.

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

CHEN, W.; YAO, Q.; PATIL, G. B.; AGARWAL, G.; DESHMUKH, R. K.; LIN, L.; WANG, B.; WANG, Y.; PRINCE, S. J.; SONG, L.; XU, D.; AN, Y. C.; VALLIYODAN, B.; VARSHNEY, R. K.; NGUYEN, H. T. Identification and Comparative Analysis of Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissue under Drought and Flooding Stress Revealed by RNA-Seq. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. July, p. 1044, 2016.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 225–236, 2004.

CHOI, H. I.; HONG, J. H.; HA, J. O.; KANG, J. Y.; KIM, S. Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1723–1730, 2000.

CHRISTIANSON, J. A.; WILSON, I. W.; LLEWELLYN, D. J.; DENNIS, E. S. The low-oxygen-induced NAC domain transcription factor ANAC102 affects viability of Arabidopsis seeds following low-oxygen treatment. **Plant physiology**, v. 149, n. 4, p. 1724–38, 2009.

CHURASIA, A.; SINGH, J.; KUMAR, A. Production of Biodiesel From Soybean Oil Biomass As Renewable Energy Source. **Journal of Environment Biology**, v. 37, n. January, p. 91–100, 2016.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, terceiro levantamento, dezembro de 2018, v. 6, n. 3, p. 1–127, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, primeiro levantamento, outubro de 2018, v. 6, n. 1, p. 1–129, 2018. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>

COLEMAN, H. D.; ELLIS, D. D.; GILBERT, M.; MANSFIELD, S. D. Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. **Plant Biotechnology Journal**. v. 4, n. 1, p. 87-101, 2006.

COSTA, N. L. **Boletim Analítico do Mercado da Soja**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. v. 3, n.1, 2018.

DA SILVA, A. R. A.; BEZERRA, F. M. L.; DE LACERDA, C. F.; FILHO, J. V. P.; DE FREITAS, C. A. S. Trocas gasosas em plantas de girassol submetidas à deficiência hídrica em diferentes estádios fenológicos. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 1, p. 86–93, 2013.

DAKORA, F. D.; ATKINS, C. A. Adaptation of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.) to growth in rhizospheres containing nonambient pO₂. **Plant physiology**, v. 96, n. 3, p. 728, 1991.

DALL´AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. **Circular Técnica Embrapa Soja**, v. 74, p. 1–20, 2010.

DAMANIK, R. I.; MARBUN, P.; SIHOMBING, L. Antioxidant activity of seedling growth in selected soybean genotypes (*Glycine max* (L.) Merrill) responses of submergence. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 41, n. 1, 2016.

DAVIES, W. J.; WILKINSON, S.; LOVEYS, B. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. **New Phytologist**, v. 153, n. 3, p. 449–460, 2002.

DE ZELICOURT, A.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 677–685, 2016.

DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F. U.; GROVER, A.; ISMOND, K. P.; GOOD, A. G.; PEACOCK, W. J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 342, p. 89–97, 2000.

DORDAS, C. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. **Plant Science**, v. 176, n. 4, p. 433–440, 2009.

DORDAS, C.; HASINOFF, B. B.; IGAMBERDIEV, A. U.; MANAC'H, N.; RIVOAL, J.; HILL, R. D. Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. **Plant Journal**, v. 35, n. 6, p. 763–770, 2003.

DORDAS, C.; HASINOFF, B. B.; RIVOAL, J.; HILL, R. D. Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 66–72, 2004.

DORDAS, C.; RIVOAL, J.; HILL, R. D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. **Annals of Botany**, v. 91, n. SPEC. ISS. JAN., p. 173–178, 2003.

DOSS, B. D. Effect of Soil Water Stress at Various Growth Stages on Soybean Yield. **Agronomy Journal**, v. 66, n. March-April 1974, p. 297–299, 1974.

DREW, M. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Flooding and plant growth**. Orlando, Florida: Academic Press Inc., 1997. p. 47–128.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2017/2018)**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of Soybean Development**. Iowa: Iowa State University. 1977. v. 80

FELLE, H. H. pH regulation in anoxic plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 4, p. 519–532, 2005.

FELLER, U.; ANDERS, I.; MAE, T. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 7, p. 1615-1624, 2007.

FERRARI, E.; PAZ, A.; SILVA, A. C. Seca No Metabolismo Da Soja Em Semeaduras Antecipadas No Mato Grosso. **Nativa - Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 67–77, 2015.

FISHER, L.; SCOTFORD, E.; BARRITT, Em. The Legally Disruptive Nature of Climate Change. In: **The Modern Law Review**, v. 80, p. 173–201, 2017.

FLEXAS, J.; BARÓN, M.; BOTA, J.; DUCRUET, J. M.; GALLÉ, A.; GALMÉS, J.; JIMÉNEZ, M.; POU, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAJNANI, C.; TOMÀS, M.; MEDRANO, H. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandierixV. rupestris). **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 8, p. 2361–2377, 2009.

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**, v. 6, n. 3. p 269- 279. 2008.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355–364, 2003.

FRANÇA-NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; DE PÁDUA, G. P.; LORINI, I.; HENNING, F. A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja. 2016. 84p.

FREITAS, M. C. M. de. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 7, p. 1–12, 2011.

FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, F. A.; MARCOLINO-GOMES, J.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–15, 2017.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 17, n. December, p. 3470–3488, 2005.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, n. 4, p. 509–525, 2011.

FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 147, n. 1, p. 15–27, 2013.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia - Is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 449–456, set. 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**, v.7, n. 103, p. 1988–1993, 2006.

GARROCHO-VILLEGAS, V.; GOPALASUBRAMANIAM, S.K.; ARREDONDO-PETER, R. Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery. **Gene**, v. 398, n. 1-2, p. 78-85, 2007.

GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 1, p. 17–20, 2005.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 247–256, 2003.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GIBBS, D. J.; LEE, S. C.; ISA, N. M.; GRAMUGLIA, S.; FUKAO, T.; BASSEL, G. W.; CORREIA, C. S.; CORBINEAU, F.; THEODOULOU, F. L.; BAILEY-SERRES, J.; HOLDSWORTH, M. J. Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. **Nature**, v. 479, n. 7373, p. 415–8, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GILLMAN, J. D.; KIM, W. S.; SONG, B.; OEHRLE, N. W.; TAWARI, N. R.; LIU, S.; KRISHNAN, H. B. Whole-Genome Resequencing Identifies the Molecular Genetic Cause for the Absence of a Gy5 Glycinin Protein in Soybean PI 603408. **G3 (Bethesda)**, v. 7, n. 7, p. 2345-2352, 2017.

GÓMEZ-PORRAS, J. L.; RIAÑO-PACHÓN, D.; DREYER, I.; MAYER, J. E.; MUELLER-ROEBER, B. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–13, 2007.

GOOD, A. G.; CROSBY, W. L. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1305–1309, 1989.

GOODMAN, M. D.; HARGROVE, M. S. Quaternary Structure of Rice Nonsymbiotic Hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6834–6839, 2001.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 1–14, 2012.

GRAETHER, S. P.; BODDINGTON, K. F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 10–11, 2014.

GRATÃO, P. L.; CARVALHO, R. F.; MONTEIRO, C. C. **PROTÓCOLOS PARA AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS**. Laboratório de Fisiologia de Plantas – UNESP/Jaboticabal. 2014. 42p.

GUAN, W.; FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; BELL, H. A.; OTHMAN, H.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Proteomic analysis shows that stress response proteins are significantly up-regulated in resistant diploid wheat (*Triticum monococcum*) in response to attack by the grain aphid (*Sitobion avenae*). **Molecular Breeding**, v. 35, n. 2, p. 1–22, 2015.

GUPTA, K. J.; HEBELSTRUP, K. H.; MUR, L. A. J.; IGAMBERDIEV, A. U. Plant hemoglobins: Important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. **FEBS Letters**, v. 585, n. 24, p. 3843–3849, 2011.

HANIN, M.; EBEL, C.; NGOM, M.; LAPLAZE, L.; MASMOUDI, K. New sights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. November, p. 1–17, 2016.

HARTMAN, G.; WEST, E.; HERMAN, T. Crops That Feed the World 2. Soybean—Worldwide Production, Use, and Constraints Caused by Pathogens and Pests. **Food Security**, v. 3, p. 5-17. 2011.

HATTORI, Y.; NAGAI, K.; FURUKAWA, S.; SONG, X. J.; KAWANO, R.; SAKAKIBARA, H.; WU, J.; MATSUMOTO, T.; YOSHIMURA, A.; KITANO, H.; MATSUOKA, M.; MORI, H.; ASHIKARI, M. The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. **Nature**, v. 460, n. 7258, p. 1026-1030, 2009.

HEBELSTRUP, K. H.; HUNT, P.; DENNIS, E.; JENSEN, S. B.; JENSEN, E. Ø. Hemoglobin is essential for normal growth of *Arabidopsis* organs. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 1, p. 157–166, 2006.

HENZLER, T.; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in chara corallina: Model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 353, p. 2053–2066, 2000.

HILL, R. D. What are hemoglobins doing in plants? **Canadian Journal of Botany**, v. 76, n. 5, p. 707–712, 1998.

HINZ, M.; WILSON, I. W.; YANG, J.; BUERSTENBINDER, K.; LLEWELLYN, D.; DENNIS, E. S.; SAUTER, M.; DOLFERUS, R. Arabidopsis RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 757–772, 2010.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Documentos 349**-Embrapa Soja, p. 37, 2014.

HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 905–916, 2002.

HOFMANN, N. R. A NAC Transcription Factor for Flooding: SHYG Helps Plants Keep Their Leaves in the Air. **The Plant Cell**, v. 25, n. 12, p. 4771–4771, 2013.

HONNA, P. T.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L. C.; MOLINARI, M. D. C.; MARIN, S. R. R.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MERTZ-HENNING, L. M.; KANAMORI, N.; NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; URANO, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; DESIDÉRIO, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with AtGolS2 gene for drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 11, p. 157, out. 2016.

HOSSAIN, M. A.; WANI, S. H.; BHATTACHARJEE, S.; BURRITT, D. J.; TRAN, L.-S. P. Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2: **Molecular and Genetic Perspectives**. Switzerland:Springer, 2016. 604p.

HSU, F. C.; CHOU, M. Y.; PENG, H. P.; CHOU, S. J.; SHIH, M. C. Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in Arabidopsis. **PloS one**, v. 6, n. 12, 2011.

HUNT, P. W.; KLOK, E. J.; TREVASKIS, B.; WATTS, R. a; ELLIS, M. H.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, n. 26, p. 17197–17202, 2002.

HUNT, P. W.; WATTS, R. A.; TREVASKIS, B.; LLEWELYN, D. J.; BURNELL, J.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 5, p. 677–692, 2001.

IGAMBERDIEV, A. U.; BARON, K.; MANAC'H-LITTLE, N.; STOIMENOVA, M.; HILL, R. D. The haemoglobin/nitric oxide cycle: Involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. **Annals of Botany**, v. 96, n. 4, p. 557–564, 2005.

IGAMBERDIEV, A. U.; HILL, R. D. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: An alternative to classic fermentation pathways. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2473–2482, 2004.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Porto Alegre, 2016. 199p.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. **Annals of Botany**. v. 96, p. 501-505, 2005.

JAIN, V.; SINGLA, N. K.; JAIN, S.; GUPTA, K. Activities of enzymes of fermentation pathways in the leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum (*Sorghum Bicolor L.*) during flooding. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 16, n. 3, p. 241-247, 2010.

JIANG, S.; CHI, Y.; WANG, J.; ZHOU, J.; CHENG, Y.; ZHANG, B.; MA, A.; VANITHA, J.; RAMACHANDRAN, S. Sucrose metabolism gene families and their biological functions. **Scientific Reports**. v. 5, 2015.

JIANG, Y.; GUO, W.; ZHU, H.; RUAN, Y. L.; ZHANG, T. Overexpression of GhSusA1 increases plant biomass and improves cotton fiber yield and quality. **Plant Biotechnology Journal**. v. 10, n. 3, p. 301-312, 2012.

JUNK, W.J. Wetlands of Tropical South America. In: WHIGHAM, D.; HEJNÝ, S.; DYKYJOVÁ, D. **Wetlands of the World I: Inventory, Ecology and Management**. Dr. W. Junk Publ., Dordrecht, Boston: 679-739. 1993.

KANG, J.; CHOI, H.; IM, M.; KIM, S. Y. Arabidopsis Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 14, n. 2, p. 343–357, 2002.

KAWASHIMA, K.; SUGANUMA, N.; TAMAOKI, M.; KOUCHI, H. Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. **Plant physiology**, v. 125, n. 2, p. 641-51, 2011.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic Metabolism in Plants. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 1–6, 1992.

KIM, S.; KANG, J. Y.; CHO, D. I.; PARK, J. H.; SOO, Y. K. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. **Plant Journal**, v. 40, n. 1, p. 75–87, 2004.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Nursing times**, v. 6, n. 6, p. 262–267, 2001.

KOMATSU, S.; THIBAUT, D.; HIRAGA, S. Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. **Plant Molecular Biology**, v. 77, n. 3, p. 309–322, 2011.

KOMATSU, S.; YAMAMOTO, R.; NANJO, Y.; MIKAMI, Y.; YUNOKAWA, H.; SAKATA, K. A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 10, p. 4766–4778, 2009.

KUBO, H. Über hämoprotein aus den wurzelknöllchen von leguminosen. **Acta Phytochim**, Tokyo. v. 11, p. 195-200, 1939

KULCHESKI, F. R. **Identificação e Análise de Expressão de microRNAs em Soja sob Estresses Bióticos e Abióticos**. 2013. 184f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

KURUTHUKULANGARAKOOLA, G. T.; ZHANG, J.; ALBERT, A.; WINKLER, B.; LANG, H.; BUEGGER, F.; GAUPELS, F.; HELLER, W.; MICHALKE, B.; SARIOGLU, H.; SCHNITZLER, J. P.; HEBELSTRUP, K. H.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-fixation by non-symbiotic haemoglobin proteins in *Arabidopsis thaliana* under N-limited conditions. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 1, p. 36–50, 2017.

LATA, C.; YADAV, A.; PRASAD, M. Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance. *In*: SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic Stress Response in Plants**. IntechOpen, 2011.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4731–4748, 2011.

LAWLOR, D. W. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. **Annals of Botany**. V. 89, n. 7, p. 871-885, jun. 2002.

LEITE, J. P.; BARBOSA, E. G. G.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F. C.; PAGLIARINI, R. F.; CRUZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; GUIMARÃES, F. C. M.; YOSHIDA, T.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINOZAKI, K. Y.; DESIDÉRIO, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1 Δ QT) improves soybean responses to water deficit. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 6272–6286, 2014.

LEIVA-ERIKSSON, N.; PIN, P. A.; KRATF, T.; DOHM, J. C.; MINOCHE, A. E.; HIMMELBAUER, H.; BÜLOW, L. Differential expression patterns of non-symbiotic hemoglobins in sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*). **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 4, p. 834–844, 2014.

LI, S.; YU, X.; CHENG, Z.; YU, X.; RUAN, M.; LI, W.; PENG, M. Global Gene Expression Analysis Reveals Crosstalk between Response Mechanisms to Cold and Drought Stresses in Cassava Seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. July, p. 1–18, 2017.

LIANG, C. Genetically Modified Crops with Drought Tolerance: Achievements, Challenges, and Perspectives. In: **Drought Stress Tolerance in Plants**, v. 2, 2016. p. 531–547.

LICAUSI, F.; KOSMACZ, M.; WEITS, D. a.; GIUNTOLI, B.; GIORGI, F. M.; VOESENEK, L. a. C. J.; PERATA, P.; VAN DONGEN, J. T. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. **Nature**, v. 479, n. 7373, p. 419–422, 2011.

LICAUSI, F.; VAN DONGEN, J. T.; GIUNTOLI, B.; NOVI, G.; SANTANIELLO, A.; GEIGENBERGER, P.; PERATA, P. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 62, n. 2, p. 302–315, 2010.

LIRA-RUAN, V.; RUIZ-KUBLI, M.; ARREDONDO-PETER, R. Expression of non-symbiotic hemoglobin 1 and 2 genes in rice (*Oryza sativa*) embryonic organs. **Communicative & integrative biology**, v. 4, n. 4, p. 457–8, 2011.

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**, v. 10, n. 8, p. 1391, 1998.

LORETI, E.; VAN VEEN, H.; PERATA, P. Plant responses to flooding stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 33, p. 64–71, 2016.

LUCIŃSKI, R.; POLCYN, W.; RATAJCZAK, L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* - Legumes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p. 537–546, 2002.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1064–1068, 2009.

MAFAKHERI, A.; SIOSEMARDEH, A.; BAHRAMNEJAD, B.; STRUIK, P. C.; SOHRABI, Y. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein,

carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*cicer arietinum*) cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 10, p. 1255–1260, 2011.

MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. Brasil, 2018. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/index.html>

MARCOLINO-GOMES, J.; NAKAYAMA, T. J.; MOLINARI, H. B. C.; BASSO, M. F.; HENNING, L. M. M.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. L. Functional Characterization of a Putative Glycine max ELF4 in Transgenic Arabidopsis and Its Role during Flowering Control. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–14, 2017.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; NAKAYAMA, T. J.; REIS, R. R.; FARIAS, J. R. B.; HARMON, F. G.; MOLINARI, H. B. C.; MOLINARI, M. D. C.; NEPOMUCENO, A. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

MARCOS-FILHO, F. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659p.

MARICLE, B. R.; WHITE, S. J.; MERAZ, A.; MAFORO, N. G.; BIGGS, T. N.; MARTIN, N. M.; CAUDLE, K. L. Effect of Ethanol Toxicity on Enzyme Activity in Anaerobic Respiration in Plants. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 117, n. 3 & 4, p. 237–244, 2014.

MARINHO, J. P.; KANAMORI, N.; FERREIRA, L. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; CORRÊA CARVALHO, J. de F.; FREITAS, R. A.; MARIN, S. R. R.; RODRIGUES, F. A.; MERTZ-HENNING, L. M.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; NEPOMUCENO, A. L. Characterization of Molecular and Physiological Responses Under Water Deficit of Genetically Modified Soybean Plants Overexpressing the AtAREB1 Transcription Factor. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 2, p. 410–426, 2015.

MARQUES, D. N.; BARROS, N. L. F.; SILVA, D. T.; SOUZA, C. R. B. Strategies for gene prospecting of plants in response to drought and salinity. In: URBANO, K. V. **Advances in Genetics Research**. New York: Nova Science Publishers, 2015. p. 2–4.

MASOUMI, A.; KAFI, M.; KHAZAEI, H.; DAVARI, K. Effect of drought stress on water status, electrolyte leakage and enzymatic antioxidants of Kochia (*Kochia scoparia*) under saline condition. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 5, p. 3517–3524, 2010.

MELLEMA, S.; EICHENBERGER, W.; RAWYLER, A.; SUTER, M.; TADEGE, M.; KUHLEMEIER, C. The ethanolic fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen. **Plant Journal**, v. 30, n. 3, p. 329–336, 2002.

MINCHIN, F. R. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 881–888, 1997.

MIRZAEI, M.; MOIENI, A.; GHANATI, F. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 3, p. 593–602, 2013.

MISSIO, E. L.; ASSIS, S. De; RUBIN, L.; GABE, N. L.; OZELAME, J. G. Desempenho de genótipos de soja em solo hidromórfico de várzea. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 16, n. 1, p. 23–29, 2010.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: The new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300–309, 2011.

MIYASHITA, Y.; GOOD, A. G. Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 1, p. 92–102, 2008.

MIYASHITA, Y.; GOOD, A. G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 667–680, 2008.

MORRISON, M. J.; VOLDENG, H. D.; COBER, E. R. Agronomic changes from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. **Agronomy Journal**, v. 92, n. 4, p. 780–784, 2000.

MOTJ, A. C. Nonsymbiotic Plant Hemoglobins: Synopsis and Perspectives of Their Structure. **Acta Metallomica – MEEMB**, v. 11, n. 2-4, p. 163-169, 2014.

MUNNÉ-BOSCH, S.; MÜLLER, M. Hormonal cross-talk in plant development and stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. December, p. 1–2, 2013.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651–681, 2008. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

NADERI, R.; VALIZADEH, M.; TOORCHI, M.; SHAKIBA, M. R. Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 58, n. 2, p. 95–101, 2014.

NAIDOO, G. Effects of Flooding on Leaf Water Potential and Stomatal Resistance in *Bruguiera Gymnorhiza* (L.) Lam. **New Phytologist**, v. 93, n. 3, p. 369–376, 1983.

NAKANO, T.; SUZUKI, K.; FUJIMURA, T.; SHINSHI, H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 411–432. 2006.

NAKASHIMA, K.; KANAMORI, N.; NAGATOSHI, Y.; FUJITA, Y.; TAKASAKI, H.; URANO, K.; MOGAMI, J.; MIZOI, J.; MERTZ-HENNING, L. M.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARIN, S. R. R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L.; BRAZIL. Application of Biotechnology to Generate Drought-Tolerant Soybean Plants in Brazil: Development of Genetic Engineering Technology of Crops with Stress Tolerance Against Degradation of Global Environment: Application of Cutting-edge Science and Technology. In: KOKUBUN, M.; ASANUMA, S. **Crop Production under Stressful Conditions**. Singapore: Springer Singapore. p. 113–130, 2018.

NAKAYAMA, T. J.; RODRIGUES, F. A.; NEUMAIER, N.; MARCOLINO-GOMES, J.; FARIAS, J. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; BORÉM, A.; DE OLIVEIRA, A. C.;

NEPOMUCENO, A. L. Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. **Genetic and Molecular Research: GMR**, v. 13, n. 1, p. 860-871. 2014.

NAKAYAMA, T. J.; RODRIGUES, F. A.; NEUMAIER, N.; MARCOLINO-GOMES, J.; MOLINARI, H. B. C.; SANTIAGO, T. R.; FORMIGHIERI, E. F.; BASSO, M. F.; FARIAS, J. R. B.; EMYGDIO, B. M.; DE OLIVEIRA, A. C. B.; CAMPOS, Â. D.; BORÉM, A.; HARMON, F. G.; MERTZ-HENNING, L. M.; NEPOMUCENO, A. L. Insights into soybean transcriptome reconfiguration under hypoxic stress: Functional, regulatory, structural, and compositional characterization. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–20, 2017.

NARITA, I. Y. **Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

NASH, L. J.; GRAVES, W. R. Drought and Flood Stress Effects on Plant Development and Leaf Water Relations of Five Taxa of Trees Native to Bottomland Habitats. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, n. 6, p. 845–850, 1993.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1237–1247, 2002.

NISHIUCHI, S.; YAMAUCHI, T.; TAKAHASHI, H.; KOTULA, L.; NAKAZONO, M. Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. **Rice** (New York, N.Y.), v. 5, n. 1, p. 2, 2012

NOWICKA, B.; CIURA, J.; SZYMAŃSKA, R.; KRUK, J. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, p. 415-433, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.022>

OH, M. W.; KOMATSU, S. Characterization of proteins in soybean roots under flooding and drought stresses. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 161–181, 2015.

OHWAKI, Y.; KAWAGISHI-KOBAYASHI, M.; WAKASA, K.; FUJIHARA, S.; YONEYAMA, T. Induction of class-1 non-symbiotic hemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n. 2, p. 324-331, 2005.

ORELLANA, S.; YAÑEZ, M.; ESPINOZA, A.; VERDUGO, I.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ-LARA, S.; CASARETTO, J. A.; CASARETTO, J. A. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 12, p. 2191–2208, 2010.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of brazilian soybean cultivars - evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, Japan, v. 7, n. 2, p. 129-137, 2004.

PAPDI, C.; ÁBRAHÁM, E.; JOSEPH, M. P.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the Controlled cDNA Overexpression System. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 1, p. 45–48, 2008.

PARK, C. J.; SEO, Y. S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 4, p. 323–333, 2015.

PARK, S. Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D. R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T. F. F.; ALFRED, S. E.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, N. J.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, P. L.; MCCOURT, P.; ZHU, J. K.; SCHROEDER, J. I.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1068–1071, 2009.

PEGANO, M. C.; MIRANSARI, M. The Importance of Soybean Production Worldwide. *In*: MIRANSARI, M. **Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production**. 1 ed. Academic Press, 2015. p. 1-26.

PERATA, P.; ALPI, A. Plant responses to anaerobiosis. **Plant Science**, v. 93, n. 1–2, p. 1–17, 1993.

PERAZZOLLI, M.; DOMINICI, P.; ZAGO, M. C. R.-P. E.; ZEIER, J.; SONODA, M.; LAMB, C.; DELLEDONNEA, M. Arabidopsis Nonsymbiotic Hemoglobin AHb1 Modulates Nitric Oxide Bioactivity. **The Plant Cell**, v. 16, n. October, p. 2785–2794, 2004.

PERAZZOLLI, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; DELLEDONNE, M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 479–488, 2006.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression Software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869–882, 2011.

PINTO, L. F. S.; MIGUEL, P.; PAULETTO, E. A. Solos de várzea e terras baixas. In: EMYGDIO, B. M.; ROSA, A. P. S. A.; OLIVEIRA, A. C. B. **Cultivo de soja e milho em terras baixas do Rio Grande do Sul**. Brasília: Embrapa, p. 23-43, 2017.

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. M. de O. Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 285–321, 2003.

PRATAP, A.; GUPTA, S. K.; KUMAR, J.; SOLANKI, R. K. Soybean. In: GUPTA, S. K. **Technological Innovations in Major World Oil Crops**, Volume 2: Perspectives. New York: Springer-Verlag. 2012. p. 1–322.

PREISZNER, J.; VANTOAI, T.; HUYNH, L.; BOLLA, R.; YEN, H. Structure and activity of a soybean Adh promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 8, p. 763–769, 2001.

PUHAKAINEN, T.; HESS, M. W.; MÄKELÄ, P.; SVENSSON, J.; HEINO, P.; PALVA, E. T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 5, p. 743–753, 2004.

QUAN, L.; ZHANG, B.; SHI, W.; LI, H. Hydrogen peroxide in plants, a versatile molecule of the reactive oxygen species network.pdf. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2–18, 2008.

RATNADASS, A.; FERNANDES, P.; AVELINO, J.; HABIB, R. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 273–303, 2012.

RECCHIA, G. H.; CALDAS, D. G. G.; BERALDO, A. L. A.; DA SILVA, M. J.; TSAI, S. M. Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7155–7179, 2013.

REJEB, I.; PASTOR, V.; MAUCH-MANI, B. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. **Plants**, v. 3, n. 4, p. 458–475, 2014.

RIBAS-CARBO, M.; TAYLOR, N. L.; GILES, L.; BUSQUETS, S.; FINNEGAN, P. M.; DAY, D. a; LAMBERS, H.; MEDRANO, H.; BERRY, J. A; FLEXAS, J. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. **Plant Physiology**, v. 139, n. September, p. 466–473, 2005.

RICARD, B.; COUÉE, I.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P. H.; SAINT-GES, V.; PRADET, A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 1–10, 1994.

RICHBERG, M. H.; AVIV, D. H.; DANGL, J. L. Dead cells do tell tales. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 6, p. 480–485, 1998.

RICOULT, C.; CLIQUET, J. B.; LIMAMI, A. M. Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 1, p. 30–39, 2005.

RICOULT, C.; ECHEVERRIA, L. O.; CLIQUET, J. B.; LIMAMI, A. M. Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3079–3089, 2006.

RIQUELME, A.; HINRICHSEN, P. Non-symbiotic hemoglobin and its relation with hypoxic stress. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 75, n.1, p. 80-89, 2015.

RIVOAL, J.; RICARD, B.; PRADET, A. Lactate-Dehydrogenase in *Oryza-Sativa* I Seedlings and Roots - Identification and Partial Characterization. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 682–686, 1991.

RIZAL, G.; KARKI, S. Alcohol dehydrogenase (ADH) activity in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) under flooding stress. **Electronic Journal of Plant Breeding**. v. 2, n. 1, p. 50-57, 2011.

ROBERTS, J. K.; CALLIS, J.; JARDETZKY, O.; WALBOT, V.; FREELING, M. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 19, p. 6029–6033, 1984.

ROBERTS, J. K.; KEY, J. L. Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene. **Plant Molecular Biology**, v. 16, n. 4, p. 671–683, 1991.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAUJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; SODEK, L.; FERNIE, A. R.; VAN DONGEN, J. T. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, p. 1501–1513, 2010.

ROCHA, R. S. Avaliação de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 59, 2009.

RODRIGUES, F. A.; MARCOLINO-GOMES, J.; DE FÁTIMA CORRÊA CARVALHO, J.; DO 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, n. 1, p. 304–314, 2012.

RODRIGUES, F. A.; PAGLIARINI, R. F.; MARCOLINO-GOMES, NAKAYAMA, T. J.; MOLINARI, H. B. C.; LOBO, F.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. L. Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC Genomics**, v. 15, n. 505, 2015.

RODRIGUES, L. V.; ROGGIA, S.; CRUSIOL, L. G.; CAVALLARI, L. S.; PEREIRA, J. P. V.; FERRARI F. Teor de clorofila e NDVI de soja em resposta ao ataque do percevejo-marrom, *Euschistus Hero*, **Anais VIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, Embrapa Soja, 2012.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. **RStudio**, Inc., Boston, Massachusetts, 2015. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>.

SACHS, M. M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, v. 20, n. 3, p. 761–767, 1980.

SÁENZ-RIVERA, J.; SARATH, G.; ARREDONDO-PETER, R. Modeling the tertiary structure of a maize (*Zea mays* ssp. *mays*) non-symbiotic hemoglobin. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 891–897, 2004.

SAIRAM, R. K.; DHARMAR, K.; CHINNUSAMY, V.; LEKSHMY, S.; JOSHI, R.; BHATTACHARYA, P. The role of non-symbiotic haemoglobin and nitric oxide homeostasis in waterlogging tolerance in *Vigna* species. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 3, p. 528–536, 2012.

SAKAZONO, S.; NAGATA, T.; MATSUO, R.; KAJIHARA, S.; WATANABE, M.; ISHIMOTO, M.; SHIMAMURA, S.; HARADA, K.; TAKAHASHI, R.; MOCHIZUKI, T. Variation in Root Development Response to Flooding among 92 Soybean Lines during Early Growth Stages. **Plant Production Science**, v. 17, n. 3, p. 228–236, 2014.

SALLAM, A.; SCOTT, H. D. Effects of Prolonged Flooding on Soybean During Early Vegetative Growth. **Soil Science**, v. 144, n. 1, p. 61–66, 1987.

SANTOS, A. B. Aproveitamento da soca. In: VIEIRA, N. R. DE A.; SANTOS, A.B. DOS; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil. Brasil: Embrapa Arroz e Feijão**. p. 463-492. 1999.

SASAKURA, F.; UCHIUMI, T.; SHIMODA, Y.; SUZUKI, A.; TAKENOUCI, K.; HIGASHI, S.; ABE, M. A Class 1 Hemoglobin Gene from *Alnus firma* Functions in Symbiotic and Nonsymbiotic Tissues to Detoxify Nitric Oxide. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 4, p. 441–450, 2006.

SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. A. C. J. Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 3–12, 2015.

SATO, S., KANEKO, T., NAKAMURA, Y., ASAMIZU, E., KATO, T.; TABATA, S. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fitFy-six TAC clones which cover the 5.4 Mbyte regions of the genome. **DNA Research**. 8: 311–318. 2001.

SCHMIDT, R.; WEITS, D. A.; FEULNER, C. F.; VAN DONGEN, J. T. Oxygen sensing and integrative stress signaling in plants. **Plant Physiology**, v. 176, n. February, p. pp.01394.2017, 2017.

SEKI, M.; KAMEI, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: Common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 194–199, 2003.

SEREGÉLYES, C., MUSTÁRDY, L., AYAYDIN, F., SASS, L., KOVÁCS, L., ENDRE, G., LUKÁCS, N., KOVÁCS, I., VASS, I., KISS, G.B., HORVÁTH, G.V.; DUDITS, D. Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. **FEBS Lett.** 482: 125–130. 2000

SHARMA, M.; GUPTA, S. K.; MAJUMDER, B.; MAURYA, V. K.; DEEBA, F.; ALAM, A.; PANDEY, V. Proteomics unravel the regulating role of salicylic acid in soybean under yield limiting drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 130, p. 529–541, 2018.

SHEN, Q.; ZHANG, P.; HO, T. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. **The Plant Cell**, v. 8, n. 7, 1996.

SILVA, A. A. DA. **Estudo da Resistência à Seca em Soja: Avaliações Fisiológicas, Metabólicas e Moleculares**. 2017. 112f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.

SINGH, S.; MACKILL, D. J.; ISMAIL, A. M. Physiological basis of tolerance to complete submergence in rice involves genetic factors in addition to the SUB1 gene. **AoB PLANTS**, v. 6, p. 1–20, 2014.

SINGH, S.; VARMA, A. **Rhizobium Biology and Biotechnology**. v. 50, p. 309–330, 2017.

SIONIT, N.; KRAMER, P. J. Effect of Water Stress During Different Stages of Growth of Soybean1. **Agronomy Journal**, SPRINGER VERLAG, New York, v. 69, n. 2, p. 274, 1977.

SMAGGHE, B. J.; BLERVACQ, A.-S.; BLASSIAU, C.; DECOTTIGNIES, J.-P.; JACQUOT, J.-P.; HARGROVE, M. S.; HILBERT, J.-L. Immunolocalization of non-symbiotic hemoglobins during somatic embryogenesis in chicory. **Plant signaling & behavior**, v. 2, n. 1, p. 43–9, 2007.

SMITH, D. R.; VINOGRADOV, S. N.; HOOGEWIJS, D. Hemoglobins in the genome of the cryptomonad *Guillardia theta*. **Biology Direct**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2014.

SOMERVILLE, G. A.; PROCTOR, R. A. Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: The rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

SOON, F.-F.; NG, L.-M.; ZHOU, X. E.; WEST, G. M.; KOVACH, A.; TAN, M. H. E.; SUINO-POWELL, K. M.; HE, Y.; XU, Y.; CHALMERS, M. J.; BRUNZELLE, J. S.; ZHANG, H.; YANG, H.; JIANG, H.; LI, J.; YONG, E.-L.; CUTLER, S.; ZHU, J.-K.; GRIFFIN, P. R.; MELCHER, K.; XU, H. E. Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. **Science**, v. 335, n. 6064, p. 85–88, 2012.

SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 142, p. 83–9483, 2002.

SPYRAKIS, F.; BRUNO, S.; BIDON-CHANAL, A.; LUQUE, F. J.; ABBRUZZETTI, S.; VIAPPIANI, C.; DOMINICI, P.; MOZZARELLI, A. Oxygen binding to Arabidopsis thaliana AHb2 nonsymbiotic hemoglobin: evidence for a role in oxygen transport. **IUBMB LIFE**, v. 6, n. 5, p. 355-362, May, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The Physiology of Adventitious Roots. **Plant Physiology**, v. 170, n. 2, p. 603–617, 2016.

STOIMENOVA, M.; IGAMBERDIEV, A. U.; GUPTA, K. J.; HILL, R. D. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 465–474, 2007.

STROZYCKI, P.M.; KARLOWSKI, W.M; DESSAUX, Y. Lupine leghemoglobin I: expression in transgenic Lotus and tobacco tissues. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 264, p. 173-182. 2002.

SYED, N. H.; PRINCE, S. J.; MUTAVA, R. N.; PATIL, G.; LI, S.; CHEN, W.; BABU, V.; JOSHI, T.; KHAN, S.; NGUYEN, H. T. Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 22, p. 7129–7149, 2015.

TADEGE, M.; KUHLEMEIER, C. Aerobic fermentation during tobacco pollen development. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 343–354, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 29, n. 4, p. 417–426, 2002.

TAKAHASHI, H.; YAMAUCHI, T.; COLMER, T. D.; NAKAZONO, M. Aerenchyma formation in plants. In: VAN DONGEN, J. T.; LICAUSI, F. **Low-Oxygen Stress in Plants**. India: Springer-Verlag Wien. 2014. 247–265.

TAYLOR, E. R.; NIE, X. Z.; MACGREGOR, A. W.; HILL, R. D. A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 6, p. 853–862, 1994.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p. 503–527, 2003.

THEISEN, G.; VERNETTI, F.; ANDRES, A.; DA SILVA, J. J. C. Manejo da Cultura da Soja em Terras Baixas em Safras com El-niño. **Circular Técnica - Embrapa Clima Temperado**, v. 82, p. 1–3, 2009.

THIEL, J.; ROLLETSCHEK, H.; FRIEDEL, S.; LUNN, J. E.; NGUYEN, T. H.; FEIL, R.; TSCHIRSCH, H.; MÜLLER, M.; BORISJUK, L. Seed-specific elevation of non-symbiotic hemoglobin AtHb1: beneficial effects and underlying molecular networks in *Arabidopsis thaliana*. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 48, 2011.

BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. **Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, p. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.

TREVASKIS, B.; WATTS, R. A.; ANDERSSON, C. R.; LLEWELLYN, D. J.; HARGROVE, M. S.; OLSON, J. S.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 22, p. 12230–4, 1997.

UCHIDA, A.; JAGENDORF, A. T.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, n. 3, p. 515–523, 2002.

UCHIUMI, T.; SHIMODA, T.; TSURUTA, T.; MUKOYOSHI, Y.; SUZUKI, A.; SENOO, K.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; HIGASHI, S.; ABE, M. Expression of Symbiotic

and Nonsymbiotic Globin Genes Responding to Microsymbionts on *Lotus japonicus*. **Plant Cell Physiology**, v. 43, n. 11, p. 1351-1358. 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 of the United States of America**, v. 97, n. 21, p. 11632–11637, 2000.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3 — new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2006.

VALLIYODAN, B.; VAN TOAI, T. T.; ALVES, J. D.; GOULART, P. de F. P.; LEE, J. D.; FRITSCHI, F. B.; RAHMAN, M. A.; ISLAM, R.; GROVER SHANNON, J.; NGUYEN, H. T. Expression of root-related transcription factors associated with flooding tolerance of soybean (*Glycine max*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 17622–17643, 2014.

VAN VERK, M. C.; BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M. Prospecting for genes involved in transcriptional regulation of plant defenses, a bioinformatics approach. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 88, 2011.

VARTAPETIAN, B. B.; DOLGIKH, Y. I.; POLYAKOVA, L. I.; CHICHKOVA, N. V.; VARTAPETIAN, A. B. Biotechnological approaches to creation of hypoxia and anoxia tolerant plants. **Acta Naturae**, v. 6, n. 21, p. 19–30, 2014.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, v. 79, n. 1, p. 3–20, 1997.

VEDELAGO, A. **Adubação para Soja em Terras Baixas Drenadas no Rio Grande do Sul**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

VENTURINI, E. F. **Técnicas de agricultura de precisão aplicadas ao manejo da adubação na rotação arroz irrigado com soja**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado em Agricultura de Precisão), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

VERNETTI JUNIOR, F. J.; GOMES, A. S.; SCHUCH, L. O. B. Crop rotations sustainability and successions systems in tilled plain areas in Southern Brazil - Sustentabilidade de sistemas de rotação e sucessão de culturas em solos de várzea no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1708–1714, 2009.

VINOGRADOV, S. N.; HOOGEWIJS, D.; ARREDONDO-PETER, R. What are the origins and phylogeny of plant hemoglobins? **Communicative & Integrative Biology**, v. 4, n. 1, p. 443–445, 2011.

VIOLANTE-MOTA, F.; TELLECHEA, E.; MORNA, J. F.; SARATH, G.; ARREDONDO-PETER, R. Analysis of peroxidase activity of rice (*Oryza sativa*) recombinant hemoglobin 1: Implications for in vivo function of hexacoordinate non-symbiotic hemoglobins in plants. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 21-26, 2009.

VOESENEK, L. A. C. J.; BAILEY-SERRES, J. Flood adaptive traits and processes: An overview. **New Phytologist**, v. 206, n. 1, p. 57–73, 2015.

VOESENEK, L. A. C. J.; COLMER, T. D.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F. F.; PEETERS, A. J. M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, v. 170, n. 2, p. 213–226, 2006.

WANG, H.; WANG, H.; SHAO, H.; TANG, X. Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n. February, p. 1–13, 2016.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1–14, 2003.

WANG, X.; KOMATSU, S. Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. **Journal of proteomics**, v. 172, p. 201-215. 2017.

WANG, X.; ZHU, W.; HASHIGUCHI, A.; NISHIMURA, M.; TIAN, J.; KOMATSU, S. Metabolic profiles of flooding-tolerant mechanism in early-stage soybean responding to initial stress. **Plant Molecular Biology**, v. 94, n. 6, p. 669-685, 2017.

WANG, Y. H.; KOCHIAN, L. V.; DOYLE, J. J.; GARVIN, D. F. Two tomato non-symbiotic haemoglobin genes are differentially expressed in response to diverse changes in mineral nutrient status. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 5, p. 673–680, 2003.

WATTS, R. a; HUNT, P. W.; HVITVED, A N.; HARGROVE, M. S.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10119–24, 2001.

WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 569–628, 2001.

WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. ABA-Based Chemical Signalling: The Coordination of Responses to Stress in Plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 195-210, 2002.

WITTY, J. F.; SKØT, L.; REVSBECH, N. P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂diffusion. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, n. 7, p. 1129–1140, 1987.

WU, C.; CHEN, P.; HUMMER, W.; ZENG, A.; KLEPADLO, M. Effect of Flood Stress on Soybean Seed Germination in the Field. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, n. 01, p. 53–68, 2017.

XIE, T.; GU, W.; ZHANG, L.; LI, C.; LI, W.; WEI, S. Exogenous DCPTA ameliorates the soil drought effect on nitrogen metabolism in maize during the pre-female inflorescence emergence stage. **BioRxiv**, p. 1–18, 2018.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **Plant Hormones and Environmental Signals**. p. 165-183, 2002.

XIONG, L.; ZHU, J. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 131–139, 2002.

XU, K.; XU, X.; FUKAO, T.; CANLAS, P.; MAGHIRANG-RODRIGUEZ, R.; HEUER, S.; ISMAIL, A. M.; BAILEY-SERRES, J.; RONALD, P. C.; MACKILL, D. J. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, v. 443, n. 7103, p. 705-708, 2006.

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, n. 1, p. 781–803, 2006.

YAMAUCHI, N.; FUNAMOTO, Y.; SHIGYO, M. Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1–2, p. 221–228, 2004.

YEUNG, E.; VAN VEEN, H.; VASHISHT, D.; SOBRAL PAIVA, A. L.; HUMMEL, M.; RANKENBERG, T.; STEFFENS, B.; STEFFEN-HEINS, A.; SAUTER, M.; DE VRIES, M.; SCHUURINK, R. C.; BAZIN, J.; BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J.; SASIDHARAN, R. A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. E6085–E6094, 2018.

YIN, X.; NISHIMURA, M.; HAJIKA, M.; KOMATSU, S. Quantitative Proteomics Reveals the Flooding-Tolerance Mechanism in Mutant and Abscisic Acid-Treated Soybean. **Journal of Proteomic Research**, v. 15, n. 6, p. 2008-2025. 2016.

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. **Plant Journal**, v. 61, n. 4, p. 672–685, 2010.

ZANDKARIMI, H.; EBADI, A.; SALAMI, S. A.; ALIZADE, H.; BAISAKH, N. Analyzing the expression profile of AREB/ABF and DREB/CBF genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.). **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Drought-Stress-Induced Changes in Activities of Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase in Wheat Species. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 5, p. 785–791, 1994.

ZHANG, M.; LIU, Y.; SHI, H.; GUO, M.; CHAI, M.; HE, Q.; YAN, M.; CAO, D.; ZHAO, L.; CAI, H.; QIN, Y. Evolutionary and expression analyses of soybean basic Leucine zipper transcription factor family. *BMC Genomics*, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2018.

ZHANG, S.-W.; LI, C.-H.; CAO, J.; ZHANG, Y.-C.; ZHANG, S.-Q.; XIA, Y.-F.; SUN, D.-Y.; SUN, Y. Altered Architecture and Enhanced Drought Tolerance in Rice via the Down-Regulation of Indole-3-Acetic Acid by TLD1/OsGH3.13 Activation. **Plant physiology**, v. 151, n. December, p. 1889–1901, 2009.

ZHANG, X. H.; MOLONEY, M. M.; CHINNAPPA, C. C. Analysis of an ABA- and osmotic stress-inducible dehydrin from *Stellaria longipes*. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, n. 5, p. 617–622, 1996.

ZHAO, L.; GU, R.; GAO, P.; WANG, G. A nonsymbiotic hemoglobin gene from maize, ZmHb, is involved in response to submergence, high-salt and osmotic stresses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 2, p. 227–237, 2008.

ZHU, Y. N.; SHI, D. Q.; RUAN, M. Bin; ZHANG, L. L.; MENG, Z. H.; LIU, J.; YANG, W. C. Transcriptome analysis reveals crosstalk of responsive genes to multiple abiotic stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2013.

ZÖRB, C.; GEILFUS, C. M.; MÜHLING, K. H.; LUDWIG-MÜLLER, J. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. **Journal of Plant Physiology**. v. 15, n. 150, p. 220-224, 2013.

APÊNDICE A – Informações sobre as sequências com domínio *Plant globin*.

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|-----------------------------------|-------------------|--|----------------|----------------|
| Hemoglobina não simbiote 1 - AHb1 | AT2G16060.1 | MESEGKIVTFEEQEALVVKSWVMKKNSAELGLKLFKIF EIAPTTKKMFSFLRDSPIPAEQNPCLKPHAMSVFVMCCE SAVQLRKTGKVTVRETTLRLGASHSKYGVVDEHFEVAK YALLETIKEAVPEMWSPMKVAWGQAYDHLVAAIKAE MNLNS | NPkLkpHAmsvF | 63-74 |
| Hemoglobina não simbiote 2 - AHb2 | AT3G10520.1 | MGEIGTFEKQEALVKESWEILKQDIPKYSLHFFSQILEIAP AAKGLFSFLRDSDEVPNNPKLKAHAVKVFMTCEAIQ LREEGKVVVADTTLQYLSIHLKSGVIDPHFEVVKEALLRT LKEGLGEKYNEEVEGAWSQAYDHLALAIKTEMKQEES | NPkLkaHAkvF | 60-71 |
| Leghemoglobina C3 | Glyma.10G198800.1 | MGATFDKQEALVSSSFEAFKTNIPQYSVVFYTSILEKAPV AKDLFSFLANGVDPTNPKLKGHAEKLFGLVRDSAGQLKA SGTVVIDAALGSIHAQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEAVG DKWSDELSSAWEVAYDELAIAIKKAF | NPkLtgHAekIF | 56-67 |
| Leghemoglobina pseudogene | Glyma.10G198900.1 | MGATFEKQEALVNSSFEAFKANLPHHSVVFNSILEKAP AAKNMFSFLGDAVDPKNPKLAGHAEKLFGLVRDSAVQL QTKGLVVADATLGPIHTQKGVTDLQFAVVKEALLKTIKEA VGDKWSEELSNWEVAYDEIAIAIKKAMAIGSLV | NPkLagHAekIF | 56-67 |
| Leghemoglobina C1 | Glyma.10G199000.1 | MGATFEKQEALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYNSILEKAPA AKDLFSFLANGVDPTNPKLKGHAEKLFALVRDSAGQLKT NGTVVADAALVSIHAQKAVTDPQFVVVKEALLKTIKEAV GGNWSDELSSAWEVAYDELAIAIKKA | NPkLtgHAekIF | 56-67 |

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|---|-------------------|---|--------------|---------|
| Leghemoglobina A | Glyma.10G199100.1 | MVATFEKQDALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPA AKDLFSFLANGVDPTNPKLTGHAELKFALVRDSAGQLKA SGTVVADAALGSVHAQKAVTDPQFVVVKEALLKTIKAAV GDKWSDELSRAWEVAYDELAIAIKKA | NPkLtgHAekIF | 56-67 |
| Hemoglobina não simbiote 1- <i>like</i> | Glyma.11G121700.1 | MEGKGTFFEEQEALVVKSWNEMKKNSQELGLKFFKILEI APAAQQLFSLKLDSTVPLEENPKLKPHAMAVFVMTCES AVQLRKAGKVTVRESNLKRLGATHFKAGVAAEHFEVTKL ALLETIKEAVPEMWSPAMKNAWEEAHDQLAEAIKSEM KPSD | NPkLkpHAmavF | 60-71 |
| Hemoglobina não simbiote 1 | Glyma.11G121800.1 | MTTTLERGFSEEQEALVVKSWNVMKKNSGELGLKFFLKI FEIAPSAQKLFSFLRDSTVPLEQNPCLKPHAVSVFVMTCD SAVQLRKAGKVTVRESNLKRLGATHFRTGVANEHFEVTK FALLETIKEAVPEMWSPAMKNAWGEAYDQLVDAIKSE MKPPSS | NPkLkaHAvkvF | 60-71 |
| Leghemoglobina C2 | Glyma.20G191200.1 | MGATFEKQEALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPA AKDLFSFLSNGVDPSNPKLTGHAELKFLVRDSAGQLKA NGTVVADAALGSIHAQKAITDPQFVVVKEALLKTIKEAV GDKWSDELSSAWEVAYDELAIAIKKAF | NPkLtgHAekIF | 56-67 |
| Hemoglobina não simbiote - LjHb1 | Lj3g3v3338170.1 | MSTLGSTCTFFEEQEALVVKSWVMKKNSAELGLKFLKIF EIAPSAQKLFSFLRDSKVPLEENPKLKPHAMSVFVMACES AAQLRKAGKVTVRESTLKKLGATHYKYGVVNEHFEVTKF ALLDTIKEAVPEMWSPKNAWWTQAYDQLVGAIKSEM KPSSS | NPkLkpHAmavF | 63-74 |

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|----------------------------------|-----------------|---|--------------|---------|
| Hemoglobina não simbiote - LjHb2 | Lj4g3v0353430.1 | MAENTTTIATFEEQEALVVKSWNAMKKDSAELSFKFFSR ILEIAPPAKQLFSFLRDSEVPLDQNPCLKPHAMSVFLMTC ESAAQLRKEGKVTVRESNLKKGATHFKKGVPEHFEVTK QALLDTIKEAVPELWSLELKDAWAIAHDQLASAIIAEMK PES | NPkLkpHAmsvF | 64-75 |
| Hemoglobina não simbiote - LjHb1 | Lj4g3v0353440.1 | MSTLGSTCTFEEQEALVVKSWVSMKKNSAELGLKFLRIF EIAPSAQKLFSFLRDSKVPLEENPKLPHAMSVFVMTCES AAQLRKAGKVTVRESTLKKLGATHYKYGVVNEHFEVTKF ALLDTIKEAVPEMWSPKNAWTQAYDQLVGAIKSEM KPSSS | NPkLkpHAmsvF | 63-74 |
| Leghemoglobina - LjLb2 | Lj5g3v0035290.1 | MGTFAQQDALVGSSYEAFKQNLPSNSVLFYTLILEKAPA AKDMFSFLKASGPTHSPQLQAHAEKVFLARDAAAQLL AKGEVTLADASLGAVHVQKAVADPHFAVVKEALLKTVQ AAVGDKWSEELSTAWGVAYDGLAAAIK | SPqLqaHAekvF | 55-66 |
| Leghemoglobina - LjLb3 | Lj5g3v0465970.1 | MGTFAQQEALVGSSYETFKNLPTNSVLFYTGILEIAPTA KDMFSFLKESGPKHSPQLQAHAEKVFALTRDAATQLVA KGEVTLADASLGAVHVQKAVTDPHFVVVKEALLQTVKE AVGADEWSDDLSTAWEGAYDGLATAIKKA | SPqLqaHAekvF | 55-66 |
| Leghemoglobina-like | Lj5g3v1699110.1 | MATFSEEQEALVNSSWEAFSQNIPQLSIIFYTSILEKAPEA KAMFSFLKSDSGVPKDNLDEAHCEKVFELARNSALQLR AKGKVEVERIALKFLGYVHAQRRVLDPHFLVLKEALLKTL KEAMGDKWSEEVSNAWGIAYDELAVIKKGM | NLDLEAHCEKVF | 56-67 |

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|-----------------------------|-----------------|---|--------------|---------|
| Leghemoglobina- <i>like</i> | Lj5g3v1699120.1 | MEDTNNKENMVPTFERQEALVETSWEAFKKNISHYSVL FYTLFESLCGVGLIDKK | FKKNISHYSVLF | 27-39 |
| Leghemoglobina 2 | Medtr1g011540.1 | MGTFEKQEALVNSSWELFKQNPGENSVLFYTIILEKAPAA KGMFSLKDTAGVQDSPKLSHAQKVFQGMVVRDASVQL RATGGVVLGDATLGAIHIQKGVVDPHFVVVKEALLKTIKE VSGDKWSEELSTAWEVAYDALAAAIAIKKAMG | SPkLqsHAekvF | 55-66 |
| Leghemoglobina 29 | Medtr1g049330.1 | MSTFQRQEALVNSSWEAFNQNLPFYSVLFYTFILEKTPA AKNMFSFLKDSNEVIQGNPSANAHAEMVFGMVRDAAI QLQVKGEVVLEDNVLGVVHTQKGVADRHFMMVVEALL KTMKEVVGDWSEEFVAVWETAYDELAYAIAIKKMI | NPSANAHAEMVF | 57-71 |
| Leghemoglobina 29 | Medtr1g049330.1 | MSTFQRQEALVNSSWEAFNQNLPFYSVLFYTFILEKTPA AKNMFSFLKDSNEVIQGNPSANAHAEMVFGMVRDAAI QLQVKGEVVLEDNVLGVVHTQKGVADRHFMMVVEALL KTMKEVVGDWSEEFVAVWETAYDELAYAIAIKKMI | NPSANAHAEMVF | 57-71 |
| Leghemoglobina 29 | Medtr1g090820.1 | MGTFERQEALVSSSWETFNQNLPFYSVLFYTFILDKAPA AKGMFSLKDSNEVPQDNPSVNAHAQKVFQGMVVRDAAV QLQAKGEVVLDSTLGIVHTQKGVVGPHTFVVVEALLKT IKEVVGDWSEELSVAVWETAYDELAVAIKEMS | NPsVnaHAekvF | 57-68 |

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|------------------|-----------------|---|----------------|----------------|
| Leghemoglobina | Medtr5g041610.1 | MGTFENQEALVNSSWEAFKQNLPKYSVLFYTIILDKAPA AKGMFSFLKDSAGVQDSPKLQAHAEKVFGMVRDSAVQ LRVKGEVVLGDATLGAIHIQKGVVDPHFVVVKEALLKTIK EVSEDKWSEELNTAWEIAYDGLASAIKKAMN | SPkLqaHAekvF | 56-67 |
| Leghemoglobina 1 | Medtr5g066070.1 | MSTFDKQEALVNSSYEAFKQNLGYSVFFYTVILEKAPAA KGLFSFLKDSAGVQDSPQLQAHAEKVFGLVSRDSASQLRA TGGVVLGDAALGAIHIQKGVVDPHFVVVKEALLKTIKEA AGDKWSEELSTAWEVAYDALATEIKKAMS | SPqLqaHAekvF | 56-67 |
| Leghemoglobina 1 | Medtr5g080400.1 | MGTFEKQEFLVNSSWESFKQNLPGYSVLFYTIILEKAPAA KGMFSFLKNTPEVKDSPQLQAHAEKVFQMVRDAAVQL RATGEVVLGYTKVGAIHIQRGVVDPHFVVVKEALLKTIKE ASGDNWSEELNTAWEIAYDELAISIKKAVKLGMIYC | SPqLqaHAekvF | 56-67 |
| Leghemoglobina | Medtr5g080440.1 | MGTFEKQESLVNSSWESFKQNLGYSVLFYTIILEKAPAA KGMFSFLKDTTGVQDSPQLQAHAAKVFEMVRDSAVQL RATGEVILGDATLGAIHIQKGVVDPHFVVVKEALLKTIKE AAGGNWSEELSTAWEVAYDGLAASIKKSMS | SPqLqaHAakvF | 56-67 |

| Anotação | ID | Sequência proteica | Domínio | Posição |
|------------------|-----------------|--|--------------|---------|
| Leghemoglobina | Medtr5g080900.1 | MSTFEKQEALVNSSWESLKQNP GYSVLFYTIIFEKAPATK DMLSFLKGSTGVQDSPELQAHA EQVFEMVRDSGVQLR ATEGVVLENSTLGVVKEALLKTIKEASKDKWNEELRTAW KVAYDALATSIKKAMS | SPeLqHAeqvF | 55-66 |
| Leghemoglobina 3 | Medtr5g081000.1 | MGTFEKQEALVNSSFESFKQNP GYSVLFYTIILEKAPAAK GMFSFLKDSAGVQDSPKLQVHAGKVFGMVRDSAAQLR ATGGVVLGDATLGAIHIQNGVVDPHFVVVKEALLTIKES SGDKWSEELSTAWEVAYDALATAIKKAMS | SPkLqvHAgkvF | 55-66 |
| Leghemoglobina | Medtr5g081030.1 | MGTFENQEALVNSSWESFKQNLPGYSVFFYTTILEKAPA AKGMFSFLKDSTGVQDSPQLQAHA EKVF GMVRDAAV QLRATGEVVLGDATLGSIHQKGVVDPHFVVVKEALLKTI KEVVGDKWSEELSTSWEVAYDGLASAIKKAMS | SPqLqHAekvF | 56-67 |