



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL ROCKENBACH MARIN

**ADUBAÇÃO POTÁSSICA E SILENCIAMENTO DE GENES *DRIP* EM SOJA
EM CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICA**

Londrina

2024

DANIEL ROCKENBACH MARIN

**ADUBAÇÃO POTÁSSICA E SILENCIAMENTO DE GENES *DRIP* EM SOJA
EM CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Adônis Moreira

Londrina

2024

DANIEL ROCKENBACH MARIN

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito para a obtenção
do Título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Adônis Moreira

Londrina
2024

DANIEL ROCKENBACH MARIN

SILENCIAMENTO GÊNICO DE DRIP EM SOJA EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ADUBAÇÃO POTÁSSICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Adonis Moreira
Embrapa – Soja

Dra. Liliane Marcia Mertz Henning
Embrapa – Soja

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz
Embrapa – Soja

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

M337a Marin, Daniel Rockenbach .

Adubação Potássica e Silenciamento de Gene DRIP em soja em Condição de Déficit Hídrico / Daniel Rockenbach Marin. - Londrina, 2024.
69 f. : il.

Orientador: Adonis Moreira.

Coorientador: Liliane Marcia Mertz Henning.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. DREB2A - Tese. 2. edição gênica - Tese. 3. nutrição - Tese. I. Moreira, Adonis. II. Henning, Liliane Marcia Mertz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

AGRADECIMENTOS

À CAPES (CNPq) pela bolsa concedida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, a Universidade Estadual de Londrina e à Embrapa Soja por me proporcionarem o espaço, a experiência e as condições necessárias para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Adonis Moreira, por ter me concedido a oportunidade de ser seu orientado, e pelos ensinamentos científicos;

À Dra. Liliane Marcia Mertz Henning e Dra. Silvana Regina Rockenbach Marin, que tanto me ajudou possibilitando que este trabalho fosse feito

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja,

Agradeço a minha família, que esteve ao meu lado independentemente de minhas escolhas, apoiando-me e viabilizando minha caminhada;

A todos os professores que conheci nessa jornada, obrigado pelos ensinamentos.

ROCKENBACH, Daniel Marin. Adubação Potássica e Silenciamento de Gene DRIP em soja em Condição de Déficit Hídrico. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

As mudanças climáticas são ameaças para produção agrícola e segurança alimentar, o déficit hídrico está entre os fatores ambientais de maior impacto para a agricultura, causando enormes prejuízos econômicos. Para enfrentar esses efeitos, uma estratégia é identificar e modular a expressão de genes implicados em características agrônomicas relacionadas às condições climáticas. Um dos genes identificados é o fator de transcrição (FT) DREB2A (Dehydration Responsive Element Binding), a super expressão desse FT está associada ao aumento da tolerância ao déficit hídrico, visto que o DREB2A se liga à cis-elementos específicos presentes na região promotora de outros genes, ativando uma série de respostas de defesa celular em condições de déficit hídrico. No entanto, em condições normais o FT DREB2A é negativamente regulado por proteínas denominadas DRIP (DREB interacting proteins), que atuam na degradação de DREB2A, diminuindo os níveis do FT DREB2A na célula. Considerando-se esta via de regulação, o nocaute de proteínas DRIP poderia potencialmente aumentar os níveis de DREB2A. A soja possui quatro genes DRIPs, neste trabalho, foi avaliado um genótipo de soja editado com a tecnologia CRISPR-Cas para o silenciamento da expressão de dois genes DRIPs (Glyma.03G159500 e Glyma.19G161700), visando o aumento do gene DREB2A. Uma estratégia adicional de relevância para mitigar as condições ambientais adversas é a busca pelo equilíbrio adequado no processo de adubação, o potássio (K) é um dos principais nutrientes requerido pela soja, porém é encontrado em baixas concentrações nos solos tropicais e apresenta estreita relação com a resistência da planta à seca. O genótipo de soja com dois genes DRIPs editados foi avaliado em condição de déficit hídrico associado a diferentes níveis de adubação potássica para determinar o efeito do silenciamento dos genes DRIPs e da adubação potássica em condição de déficit hídrico. A edição de dois genes DRIPs (Glyma.03G159500 e Glyma.19G161700) não foi suficiente para promover aumento do gene DREB e melhoria na resposta ao déficit hídrico, sendo necessário avaliar o efeito do silenciamento de todos os genes DRIPs da soja. A adubação potássica resultou em aumento do teor de ácidos graxos, e na dose de 400 mg kg⁻¹ proporcionou aumento em componentes da produção.

Palavras-chave: DREB2A; edição gênica; nutrição

ROCKENBACH, Daniel Marin. Gene silencing of DRIP in soybeans under conditions of water deficit and potassium fertilization. Dissertation (Master's in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Climate change is a threat to agricultural production and food security, water deficit is among the environmental factors with the greatest impact on agriculture, causing enormous economic losses. To address these effects, one strategy is to identify and modulate the expression of genes implicated in agronomic traits related to climatic conditions. One of the identified genes is the transcription factor (TF) DREB2A (Dehydration Responsive Element Binding), overexpression of this TF is associated with increased tolerance to water deficit, since DREB2A binds to specific cis-elements present in the promoter region of other genes, activating a series of cellular defense responses in conditions of water deficit. However, under normal conditions, FT DREB2A is negatively regulated by proteins called DRIP (DREB interacting proteins), which act to degrade DREB2A, reducing FT DREB2A levels in the cell. Considering this regulatory pathway, knockdown of DRIP proteins could potentially increase DREB2A levels. Soybean has four DRIPs genes. In this work, a soybean genotype edited with CRISPR-Cas technology was evaluated to silence the expression of two DRIPs genes (Glyma.03G159500 and Glyma.19G161700), aiming to increase the DREB2A gene. An additional strategy of relevance to mitigate adverse environmental conditions is the search for an adequate balance in the fertilization process, potassium (K) is one of the main nutrients required by soybeans, however it is found in low concentrations in tropical soils and has a close relationship with the plant's resistance to drought. The soybean genotype with two edited DRIPs genes was evaluated under water deficit conditions associated with different levels of potassium fertilization to determine the effect of silencing DRIPs genes and potassium fertilization under water deficit conditions. The editing of two DRIPs genes (Glyma.03G159500 and Glyma.19G161700) was not sufficient to promote an increase in the DREB gene and an improvement in the response to water deficit, making it necessary to evaluate the effect of silencing all DRIPs genes in soybean. Potassium fertilization resulted in an increase in the content of fatty acids, and at a dose of 400 mg kg⁻¹ it provided an increase in production components.

Key-words: DREB2A; Gene Editing; Nutrition;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O déficit hídrico é um fator abiótico que desencadeia diversos problemas que afetam o desenvolvimento da planta, os efeitos começa pelo aumento da fototranspiração, fechamento dos estômatos e diminuição de CO₂ que irrompe na diminuição do potencial hídrico dos tecido folheares assim afetando os transportadores não cíclicos, síntese de ATP e atividades fotossintética, com a escassez de água tem um aumento na síntese de espécie reativa de oxigênio EROS que causa danos oxidativo na planta. Durante o déficit hidrico a planta inicia diversas mecanismo morfofisiológico de resposta; sendo a produção de substancia detoxicante de EROS que diminuíram os danos causado pela oxidação, um aumento na espessura da cutícula, ajuste osmótico da celular, vias metabólicas que melhoram a capitação de água pela raiz e ativação de genes que conferem tolerância

Figura 2. Quando a planta está em condições não estressantes o gene DREB2 está sendo expresso em baixos níveis, e acaba sendo submetido à via de degradação ubiquitinada pelas proteínas DRIP1 e DRIP2. A função dessas proteínas é marcar o gene DREB2, onde será levado para o proteossoma 26S onde ocorrera a degradação desse gene. Em condições estressantes a planta começa a aumentar a expressão do gene DREB2 que vai iniciar uma cascata de resposta que confere tolerância a planta sob a condição estressante. Com o silenciamento das proteínas DRIPs ocorrera um aumento na expressão do DREB2 em condições normais, assim conferindo a planta uma resposta rápida caso ocorra um estresse

Figura 3. Mecanismos de Reparo do DNA: (A) Maquinaria CRISPR quebra a sequência de DNA e podem ocorrer 2 tipos de reparo: (NHEJ e HDR). No mecanismo de reparo independente de homologia (NHEJ) pode ocorrer duas situações: (B) Deleção da sequência e (C) Inserção de uma sequência mudando o frame de leitura. Já no reparo dependente de Homologia (HDR) é requerido a presença de um DNA molde, que serve como referência para o reparo de cada uma das fitas do DNA.

Figura 4. Durante o déficit hídrico o potássio inicia uma via de resposta que atua na tolerância da planta. Esse processo pode ser realizado com potássio exógeno ou concentração interna de K, essa cascata desencadeia a ativação dos canais reguladores de K que elevaram a concentração no citosol de íons de K e assim induzir o acúmulo de soluto e translocação dos fotossimilados que mantaram o ajuste osmótico, turgor, condutância estomática e fotossintético, a regulação da NADPH que

reduzira os níveis de espécie reativa de oxigênio (EROS), essa via metabólica promovera o crescimento de raiz, broto e aumento de área foliar. Todos esses vias que o potássio percorre acabam mantendo ou aumentando a tolerância da planta ao déficit hídrico umento na expressão do DREB2 em condições normais, assim conferindo a planta uma resposta rápida caso ocorra um estresse

Figura 5. Análises moleculares para determinação de linha editada homozigota sem maquinaria Cas9. Em A resolução da PCR para a ausência de Cas9. Em B amplificação dos glymas DRIP editados. Em C análise do sequenciamento demonstrando homozigose dos genes DRIP editados.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análises de trocas gasosas no estágio vegetativo em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição em experimento realizado em casa de vegetação. Os gráficos representam os valores de Fotossíntese (A), Condutância estomática (Gs) e Concentração intercelular de CO ₂ (Ci) amostrados em plantas de soja sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada).....	26
Gráfico 2 – Altura das plantas e peso de raiz no estágio vegetativo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)..	27
Gráfico 3 – Componentes de produtividade das plantas no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR sem e editada).....	28
Gráfico 4 – Componentes nutricionais (óleo e proteína) das plantas no estágio vegetativo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). As letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR e Linha Editada)	29
Gráfico 5 – Teores de ácidos graxos nos grãos de soja das plantas no estágio vegetativo, em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)	31
Gráfico 6 – Expressão gênica em folhas de soja das plantas no estágio vegetativo, em experimento realizado em casa de vegetação amostradas em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição.....	32
Gráfico 7 – Análises de trocas gasosas no estágio reprodutivo em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição em experimento	

realizado em casa de vegetação. Os gráficos representam os valores de Fotossíntese (A), Condutância estomática (Gs) e Concentração intercelular de CO ₂ (Ci) amostrados em plantas de soja sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)	33
Gráfico 8 – Altura das plantas e peso de raiz no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)...	34
Gráfico 9 – Componentes de produtividade das plantas no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR sem e editada).....	35
Gráfico 10 – Componentes nutricionais (óleo e proteína) das plantas no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). As letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR e Linha Editada)	36
Gráfico 11 – Teores de ácidos graxos nos grãos de soja das plantas no estágio reprodutivo, em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)	37
Gráfico 12 – Expressão gênica em folhas de soja das plantas no estágio reprodutivo, em experimento realizado em casa de vegetação amostradas em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers específicos para seleção de linhas homozigotas sem maquinaria Cas9.....	20
Tabela 2 – Propriedades químicas do solo utilizado para condução do experimento..	20
Tabela 3 – Sequências de primers forward (F) e reverse (R) desenhados para os genes GmDRIP e GmDREB2A, que foram utilizado na quantificação de expressão gênica via RT-qPCR.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
APX	Ascorbato Peroxidase
AREB	Abscísic Acid Response Elements
CAT	Catalase
DREB	Dehydration Responsive Element Binding
DRIP	DREB-Interacting Protein
ERF	Ethylene Response Factors
ERO	Espécie Reativas de Oxigênio
FT	Fator de Transcrição
JA	Jasmônico
POD	Peroxidase
SOD	Superóxido Dismutase

Sumário

1	Introdução	16
2	Revisão Bibliográfica	18
2.1	A Soja – Um Panorama Geral	18
2.2	Estresses Abióticos Na Cultura Da Soja	19
2.3	Respostas Das Plantas ao Déficit Hídrico	20
2.4	Fatores De Transcrição DREB e Edição Gênica	27
2.5	Potássio e o Déficit Hídrico	31
2.6	Objetivo e Objetivo Especifico.....	34
3	Material e Métodos	35
3.1	Obtenção Da Cultivar Editada.....	35
3.1	Seleção De Linhagem Homozigota	35
3.2	Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas	37
3.3	Determinação Componentes De Produção e Qualidade Nutricional	38
3.4	Extração Do RNA e Reação De RT-QPCR.....	39
3.5	Análise Estatística	40
4	Resultados	40
4.1	Seleção Linhagem Homozigotas	40
4.2	Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas No Estádio Vegetativo ..	41
4.3	Determinação Componentes De Produção e Teor De Nutrientes Do Grão .	44
4.4	Análise De Expressão Gênica No Estágio Vegetativo	47
4.5	Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas Reprodutivo	47
4.6	Determinação De Componentes De Produção e Qualidade Do Grão.....	50
4.7	Análise Da Expressão Gênica No Estágio Reprodutivo	53
5	Discussão	53
6	Conclusão.....	57
	REFERÊNCIAS	57

1 Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma oleaginosa de importância mundial e a principal fonte de proteína vegetal em virtude do seu elevado valor nutritivo (DU et al., 2020). Porém, o déficit hídrico por longo período influencia a fisiologia da planta, qualidade e composição química das sementes de soja (WIJEWARDANA et al., 2019). De modo geral, as condições de déficit hídrico influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, levando à diminuição da produtividade das lavouras, e acarretando grandes prejuízos (BIJALWAN et al., 2022).

Com as mudanças climáticas, os episódios de déficit hídrico vem aumentando com intensidade e duração variáveis, e assim, se tornando uma grande ameaça para a produção agrícola e segurança alimentar mundial (RAZA et al., 2019). Para enfrentar esse desafio, uma alternativa é o uso de estratégias biotecnológicas para a obtenção de plantas com características agrônômicas desejáveis. Uma técnica prática e versátil recentemente desenvolvida foi o sistema CRISPR-Cas, que permite adicionar, delatar, substituir e silenciar genes e tem sido empregada com sucesso para a edição do genoma de diversas espécies de importância agrícola, dentre elas arroz (*Oryza sativa* L.) (FENG et al., 2013), trigo (*Triticum* spp.) (SHAN et al., 2013) e milho (*Zea mays*) (WALTZ et al., 2016), tendo potencial de uso para editar genes relacionados com a tolerância à seca.

Entre os genes envolvidos nas respostas moleculares de tolerância ao déficit hídrico, está o fator de transcrição (FT) DREB2A, que interage com uma sequência DRE (Dehydration-Responsive Element) e ativa a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico e estresse salino (SAKUMA et al., 2006a). Vários trabalhos demonstraram o efeito do FT DREB2A na tolerância ao déficit hídrico por meio de superexpressão deste gene, desde em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (SAKUMA et al., 2006b), até em culturas de grande importância agrícola, como arroz (MATSUKURA et al., 2010), milho (QIN et al., 2007) e soja (ENGELS et al., 2013; FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017).

Bioquimicamente, o FT DREB2A necessita de modificações pós-traducionais para exercer sua função na resposta à desidratação celular (LIU et al., 1998). Essa regulação é realizada por duas proteínas denominadas DRIP1 e DRIP2 (DREB2A-Interacting Proteins), que funcionam como uma ubiquitina E3 ligase, permitindo a proteólise do FT DREB2A no proteossoma 26S (QIN et al., 2008). Considerando esse mecanismo de regulação gênica, os genes DRIP podem ser

manipulados via edição gênica para aumentar a expressão do FT DREB2A envolvidos na tolerância ao déficit hídrico.

Entre os efeitos que o estresse hídrico promove nas plantas, estão a degradação dos pigmentos fotossintéticos, das membranas plasmáticas e alterações no estado hídrico das plantas (DEMICHELI et al., 2023). No entanto, uma nutrição mineral adequada pode ajudar a mitigar esses efeitos adversos, e a aplicação de nutrientes, como o potássio (K), pode ativar vias metabólicas que vão atuar na estabilidade da clorofila e membranas e melhorar as relações hídricas em condições de estresse hídrico (ALAM et al., 2011).

O potássio K é um componente que otimiza muitos processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, além de melhorar a eficiência do uso de nitrogênio. Esse macronutriente desempenha um papel importante no ajuste osmótico, abertura e fechamento dos estômatos e na ativação de enzimas (MARSCHNER, 2012). Além disso, também é essencial para a translocação de fotoassimilados para o crescimento das raízes, proporcionando superfícies de absorção maiores e maior retenção de água nos tecidos da planta, e dessa forma, em condição de déficit hídrico, melhora o crescimento e o rendimento da planta (AHMAD et al., 2018).

Os componentes de produção como biomassa foliar e rendimento de grãos, além do teor relativo de água nas folhas foram relatados como altamente correlacionados com a concentração de potássio no tecido, indicando que a concentração do nutriente nas folhas tem um papel importante na tolerância ao déficit hídrico, e, portanto, a aplicação do nutriente pode controlar as reduções de rendimento de grãos (UMAR 2006). Considerando o papel do K na tolerância das plantas ao estresses abióticos, a fertilização balanceada e o uso eficiente de potássio podem contribuir para o crescimento, rendimento e reduzir os riscos ambientais (WANG et al., 2013).

Assim, a associação de estratégias biotecnológicas e de manejo nutricional podem contribuir para mitigar os efeitos adversos decorrentes das condições ambientais a que as culturas estão expostas, reduzindo assim as perdas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do silenciamento do gene DRIP em soja e da adubação potássica sob condições de déficit hídrico.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A Soja – Um Panorama Geral

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) teve origem na China, onde foi domesticada há aproximadamente 5.000 anos, derivando de seu parente selvagem, a *Glycine soja* [Sieb. And Zucc.]. Ao longo do tempo, foram desenvolvidos mais de 60.000 acessos adaptados a diversas eco-regiões, evidenciando a significativa diversidade genética da cultura (LIU et al., 2020).

No Brasil, a introdução da soja ocorreu em 1882, mas apenas a partir do final da década de 1940 passou a ser cultivada com propósitos comerciais. Graças aos avanços científicos e à implementação de tecnologias no setor produtivo, foi possível adaptar a cultura às diversas regiões edafoclimáticas do país. Esses avanços não apenas minimizam os impactos de estresses bióticos e abióticos sobre a produtividade, mas também conferiram à soja uma posição proeminente na economia brasileira e global (GAZZONI et al., 2018).

A grande importância desta leguminosa é devido a composição química dos seus grãos. A soja é a principal fonte de proteína vegetal em virtude do seu elevado valor nutritivo (DU et al., 2020). Os componentes como óleo, minerais isoflavonas e fitoestrógenos e metabólicos secundários tem sua importância no valor nutricional para alimentação humana e animal. Além da participação da indústria alimentícia a soja tem aplicação na indústria farmacêutica, indústria química e para produção de biocombustível (PATIL et al., 2018).

Além de suprir a demanda interna, a produção brasileira de soja continua a ser o principal item da pauta de exportação, especialmente para o mercado chinês, o maior consumidor mundial. Em 2023, as exportações de soja em grãos para a China atingiram US\$1,2 bilhão, representando 86,5% do volume total exportado pelo Brasil no período (MAPA, 2024, GALE et al., 2019).

Em 2023, o Brasil exportou 193,02 milhões de toneladas de grãos, marcando um aumento de 24,3% em relação a 2022. Essa quantidade representa 60,3% da safra recorde de grãos estimada em 319,86 milhões de toneladas pela Companhia Nacional de Abastecimento (MAPA, 2024). O complexo soja foi o setor que mais contribuiu para as exportações do agronegócio, em termos de valor exportado o complexo soja representou US\$ 6,49 bilhões, correspondendo a 40,4% das vendas do setor em 2023 (MAPA, 2024).

Atualmente, o Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de soja, cultivando uma área de 44 milhões de hectares na safra 2022/2023, com uma produtividade de 3.508 kg ha⁻¹ e uma produção total de 154,617 milhões de toneladas. Dados da CONAB indicam para a safra 2023/2024, uma produção estimada de 155,269 milhões de toneladas, com uma produtividade de 3,431 kg ha⁻¹ (CONAB 2024).

Este resultado representa uma diminuição de 4,2% em relação às expectativas iniciais, uma vez que as projeções iniciais apontavam para uma colheita de 162 milhões de toneladas. Um dos fatores que contribuíram para essa redução foi o fenômeno 'El Niño', causando excesso de precipitações na Região Sul e escassez de chuvas nas demais regiões do país. Na safra de 2020/2021, esse padrão climático resultou em uma queda na produção, especialmente devido ao déficit hídrico observado principalmente na Região Sul e no Mato Grosso do Sul, apresentando desafios significativos para os produtores (CONAB, 2024).

2.2 Estresses Abióticos Na Cultura Da Soja

Diversos fatores bióticos e abióticos contribuem para as flutuações anuais na produção de soja, impactando diretamente o rendimento e/ou a qualidade das sementes (HARTMAN et al., 2011). Entre esses fatores, destaca-se o déficit hídrico como a principal restrição ambiental para a produtividade e a qualidade das safras, podendo resultar em perdas significativas, chegando a atingir até 80% (DU et al., 2020).

As mudanças climáticas promovem um aumento na temperatura do ar e dos níveis atmosféricos de CO₂ e, em última análise, alteram os padrões de chuva e sua distribuição (YIN et al., 2018; YANG et al., 2019). A distribuição desuniforme das chuvas pode ocasionar perda de água dos solos por evaporação, que é impulsionada por eventos de alta temperatura, alta intensidade de luz e vento seco, e pode agravar ainda mais um evento de estresse hídrico existente (COHEN et al., 2021). A limitação de disponibilidade hídrica para as plantações é uma tendência que se intensifica ao longo do tempo.

A água interna nas plantas é, em grande parte, dissipada para a atmosfera, impulsionada pelo aumento das temperaturas, agravando ainda mais os desafios de déficit hídrico já presentes em diversos sistemas agrícolas ao redor do

mundo (SULTAN et al., 2019). Se até o final do século as projeções de aumento da temperatura do ar atingirem 2°C acima dos níveis atuais, aproximadamente um quinto da população mundial poderá ser impactada por déficits hídricos severos (RAY et al., 2019).

A seca exerce influência em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento das leguminosas, uma vez que cerca de 80-95% da biomassa fresca da planta é composta de água (DIATTA et al., 2020; SELEIMAN et al., 2021). Com as mudanças climáticas globais, a seca emerge como um dos fatores mais desafiadores e imprevisíveis, continuamente restringindo a produção agrícola e acarretando efeitos adversos em diversas culturas (NADEEM et al., 2019).

A soja é uma cultura que requer um suprimento de água adequado para atingir os altos rendimentos desejados (BUEZO et al., 2019). Entretanto, os episódios de seca estão aumentando com intensidade e duração variáveis, e se tornando uma grande ameaça para a produção agrícola e segurança alimentar mundial (RAZA et al., 2019). Nas lavouras de soja do Brasil, entre as safras de 1976- a 2014, foram computadas perdas devido à seca de US\$79,62 bilhões (FERREIRA, 2016).

Para lidar com esse desafio, diversas estratégias têm sido propostas, englobando desde a implementação de práticas adequadas de manejo e adubação do solo (SCHEBEN et al., 2016) até o cultivo de variedades aprimoradas e o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para tolerância à seca (PAIXÃO et al., 2019). Nesse contexto, o sequenciamento do genoma da soja representa um avanço significativo, proporcionando uma compreensão mais ampla dessa espécie vegetal (SCHMUTZ et al., 2010).

2.3 Respostas Das Plantas ao Déficit Hídrico

A tolerância à seca refere-se à capacidade da planta de crescer, florescer e manter seu rendimento mesmo em condições de hidratação abaixo do ideal. De maneira abrangente, as condições de déficit hídrico exercem uma influência significativa sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas, levando à redução da produção (STANIAK et al., 2023). As plantas apresentam variações em suas respostas e sensibilidades no início da seca, mas, em todos os casos, o rendimento final é prejudicado. Isso está associado à redução da germinação, diminuição da

atividade fotossintética, redução na translocação de assimilados, fixação de carbono e outros processos de desenvolvimento da planta (COSTA et al., 2024). De maneira geral, esse fenômeno compreende duas etapas distintas: a detecção ou sinalização do estresse e a ativação dos mecanismos fisiológicos, moleculares e bioquímicos de resposta nas plantas (SEHGAL et al., 2018; MAHMOOD et al., 2020).

Períodos prolongados de escassez de água levam a uma redução no teor de umidade do solo e a um baixo potencial hídrico nas partes aéreas da planta, como folhas e caules. Esses fatores resultam em uma taxa de perda de água pela transpiração das folhas que supera a taxa de absorção de água pelas raízes, especialmente em ambientes secos (GOCHE et al., 2020).

Durante as fases de desenvolvimento fisiológico, a água desempenha vários papéis, sendo um deles o crescimento celular. Devido à sua natureza como molécula pequena e sem carga, a entrada de água na célula ocorre por meio de canais específicos chamados aquaporinas. Embora essas aquaporinas forneçam um mecanismo para regular o fluxo de água, sua direcionalidade é predominantemente determinada pela discrepância na energia potencial livre da água, conhecida como potencial hídrico, através da membrana (FENG et al., 2016).

O potencial da água é governado por três componentes principais. O potencial osmótico refere-se à influência da concentração de solutos nas células sobre o movimento da água em relação ao meio extracelular. O potencial de pressão diz respeito à capacidade da parede celular de se deformar para resistir à absorção de água, à medida que a pressão interna da célula (pressão de turgor) aumenta. Por fim, o potencial mátrico abrange os efeitos das forças capilares que afetam a capacidade da água de se movimentar livremente através de uma matriz física, como o solo (ROBBINS et al., 2015).

Durante o período vegetativo sob déficit hídrico, a morfologia da planta sofre alterações, incluindo a redução da altura da planta, murcha das folhas, e modificações no número e área foliar. A altura da planta, fortemente impactada pela seca, está diretamente associada ao crescimento celular e à senescência foliar e a diminuição na altura da planta ocorre principalmente devido à redução da expansão celular, aumento na queda de folhas e comprometimento da mitose em condições de seca (YANG et al., 2021).

As folhas, como principais órgãos de assimilação e transpiração nas plantas, desempenham um papel crucial como indicadores do grau de escassez de

água. Em resposta direta a condições de seca, as plantas frequentemente apresentam folhas com áreas foliares menores, maior espessura foliar e densidade de tecido foliar elevada. A modificação da área foliar, que tem um impacto direto na fotossíntese e na produtividade das plantas, destaca-se como uma das características mais observadas nas folhas sob estresse hídrico (TAIZ et al., 2015).

A adaptação das folhas das plantas ao déficit hídrico envolve a formação de uma camada de cutícula foliar espessa e cerosa. Essa modificação resulta no desenvolvimento de características xeromórficas, incluindo um menor número de estômatos, tecidos paliçádicos mais espessos, um grande número de tricomas, folhas mais espessas e diminutas, além de tecidos vasculares bem desenvolvidos (ULLAH et al., 2017). Em contraste, quando há escassez de água, as folhas apresentam murcha, margens amareladas e supressão no desenvolvimento da parte aérea e das folhas, impactando assim o crescimento e a produtividade da planta (FANIZZA et al., 2015).

Diante de condições de déficit hídrico, as plantas implementam estratégias de adaptação para enfrentar a escassez de água. Um elemento crucial nesse processo é a capacidade das raízes de perceberem prontamente a diminuição da disponibilidade de água no solo (ANJUM et al., 2017). As raízes desempenham um papel central na resposta da planta, promovendo ajustes rápidos no potencial osmótico. Esse ajuste é essencial para manter o turgor celular, garantindo a pressão adequada da parede celular contra o conteúdo celular. A manutenção do turgor celular é vital para a integridade estrutural das células, sendo fundamental para o funcionamento saudável da planta (WOLF et al., 2022; CODJOE et al., 2023).

Além disso, as raízes respondem ao déficit hídrico aumentando a força do fluxo de água para dentro das células. Essa adaptação visa compensar a escassez de água no ambiente, garantindo que as células vegetais mantenham um suprimento adequado para suas funções vitais (SLAMINI et al., 2022).

A planta também desenvolve características específicas como parte de sua resposta ao déficit hídrico. Isso inclui o desenvolvimento de um sistema radicular mais profundo, permitindo que as raízes alcancem camadas mais profundas do solo em busca de água. Além disso, a estrutura e a regulação estomática são aprimoradas para otimizar a utilização da água disponível (LUO et al., 2019).

Dessa forma, os principais mecanismos para lidar com o estresse hídrico incluem melhoria no sistema radicular, plantas que possuem raízes longas,

alta densidade e sistema radicular intenso. Para manter a produtividade sob escassez de água, a planta precisa de raízes longas com alta densidade, principalmente quando a água é mais profunda. O sistema radicular mais denso também absorve maior quantidade de água do que as raízes mais finas porque o maior número de raízes pode entrar em contato com mais vapores de água presentes no solo (ABDELRAHEEM et al., 2019).

O déficit hídrico exerce uma influência significativa no processo fisiológico da fotossíntese, sendo essencial para o desenvolvimento da planta, uma vez que fornece os produtos fotossintéticos necessários. Durante períodos de estresse hídrico, o controle dos estômatos emerge como uma resposta crucial para evitar a perda excessiva de água. Contudo, este controle resulta em uma redução no fluxo de dióxido de carbono (CO_2) para os tecidos do mesófilo, devido à pressão de turgescência reduzida e/ou ao decréscimo do potencial hídrico. Essa condição prejudica também a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, impactando adversamente a eficiência fotossintética das plantas (YANG et al., 2021).

O cloroplasto desempenha um papel central na fotossíntese, utilizando principalmente a clorofila para absorver, transferir e converter a energia luminosa (AHAMMED et al., 2022). A clorofila, pigmento essencial e eficaz na fotossíntese, está diretamente ligada ao metabolismo contínuo das plantas e à produção vegetal. Em situações de estresse hídrico, o teor de clorofila tende a diminuir, resultando em alterações na proporção de clorofila "a", "b" e carotenóides. Essas mudanças afetam a função fotossintética das plantas, refletindo seu estado de crescimento e o grau de estresse ao qual estão submetidas (YANG et al., 2021).

O estresse hídrico desencadeia o estresse térmico, resultando na redução da solubilidade do dióxido de carbono (CO_2) e no aumento da permeabilidade das membranas tilacóides. Esse cenário favorece a fixação de oxigênio, promovendo a fotorrespiração e desestabilizando a cadeia de transporte de elétrons na fotossíntese. Essa desregulação leva a um desequilíbrio energético causado pela absorção excessiva de luz, resultando no aumento da produção de compostos oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ERO). Esse aumento de ERO, por sua vez, causa danos oxidativos aos lipídeos e proteínas presentes nas membranas (VITAL et al., 2022).

A sequência de eventos descrita tem os estômatos como componente central, regulando sua abertura e fechamento para controlar a transpiração e a

entrada de CO₂ na planta. Essa função desempenha um papel crucial na capacidade da planta de tolerar o déficit hídrico. Existe uma relação inversa entre a tolerância à seca e a condutância estomática, ou seja, o fechamento dos estômatos reduz a transpiração, aumentando a tolerância à seca. Por outro lado, a abertura dos estômatos aumenta a transpiração, diminuindo a tolerância da planta à seca (CLAUW et al., 2015).

A condutância estomática mantém uma relação direta com a fotossíntese, pois a regulação dos estômatos desempenha um papel crucial na preservação da capacidade fotossintética das plantas sob estresse hídrico. A abertura dos estômatos facilita a entrada de CO₂ nos tecidos do mesófilo, promovendo o processo fotossintético. Em contrapartida, o fechamento dos estômatos reduz a taxa de fotossíntese (PEREZ-MARTIN et al., 2014; URBAN et al., 2017).

A seca moderada impacta de forma aditiva o número de estômatos, enquanto condições de seca drástica levam a uma redução no número de estômatos. A menor taxa de transpiração, associada a uma cutícula espessa e abertura estomática reduzida, contribui para aumentar a tolerância à seca nas plantas (ILYAS et al., 2021). Diante dessas condições, as plantas desenvolvem mecanismos de defesa e homeostase celular, incluindo o acúmulo de osmólitos como prolina e glicina betaína, além de proteínas, fortalecendo assim a capacidade das plantas de lidar com o estresse. No entanto, é importante destacar que a tolerância das plantas a estresses abióticos é uma característica complexa, envolvendo uma variedade de mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos (SIDDIQUI et al., 2015).

Como mecanismo de defesa, as plantas se adaptam à combinação de déficit hídrico e altas temperaturas, ativando sistemas enzimáticos do sistema de defesa antioxidante para neutralizar o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esse processo envolve um aumento na atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POD) (CHEN et al., 2017). Além disso, são acionados mecanismos não enzimáticos para eliminar ERO, incluindo a síntese de ascorbato e a produção de flavonoides/antocianinas. Esses ajustes contribuem para a proteção das plantas diante das condições adversas de estresse hídrico e térmico combinados (JIANG et al., 2022).

Em síntese, os efeitos morfofisiológicos do estresse hídrico incluem alterações na arquitetura do sistema radicular, ampliação da estabilidade da

membrana celular, acúmulo de osmoprotetores, diminuição do turgor, alterações nas trocas gasosas da folha, redução da clorofila, bem como impactos na atividade enzimática e no equilíbrio iônico (ANJUM et al., 2017).

Muitas dessas respostas são mediadas pelo fitohormônio ABA (ácido abscísico), desencadeando ajustes osmótico e no teor relativo de água, e regulação estomática que visam preservar a reserva de água para enfrentar os desafios impostos pela escassez hídrica (ABOBATTA et al., 2019). Ocorre também, a atuação de moléculas como o cálcio, e fitohormônios como o ABA, ácido jasmônico (JA), ácido salicílico, auxinas, giberelinas e etileno, além da ativação de vias de sinalização e eliminação de ERO (ILYAS et al., 2021). Em condição de déficit hídrico, esses fitohormônios acionam vias de sinalização, para a produção de enzimas antioxidantes, metabólitos secundários e proteínas de choque térmico (ULLAH et al., 2017).

Essas respostas evidenciam a complexidade das adaptações que as plantas desencadeiam em face da escassez de água, buscando manter seu equilíbrio interno e minimizar os impactos negativos sobre seu crescimento e produtividade (NADEEM et al., 2019). Esses mecanismos são fundamentais para sua adaptação e resistência ao estresse hídrico (Figura 1) (ILYAS et al., 2021).

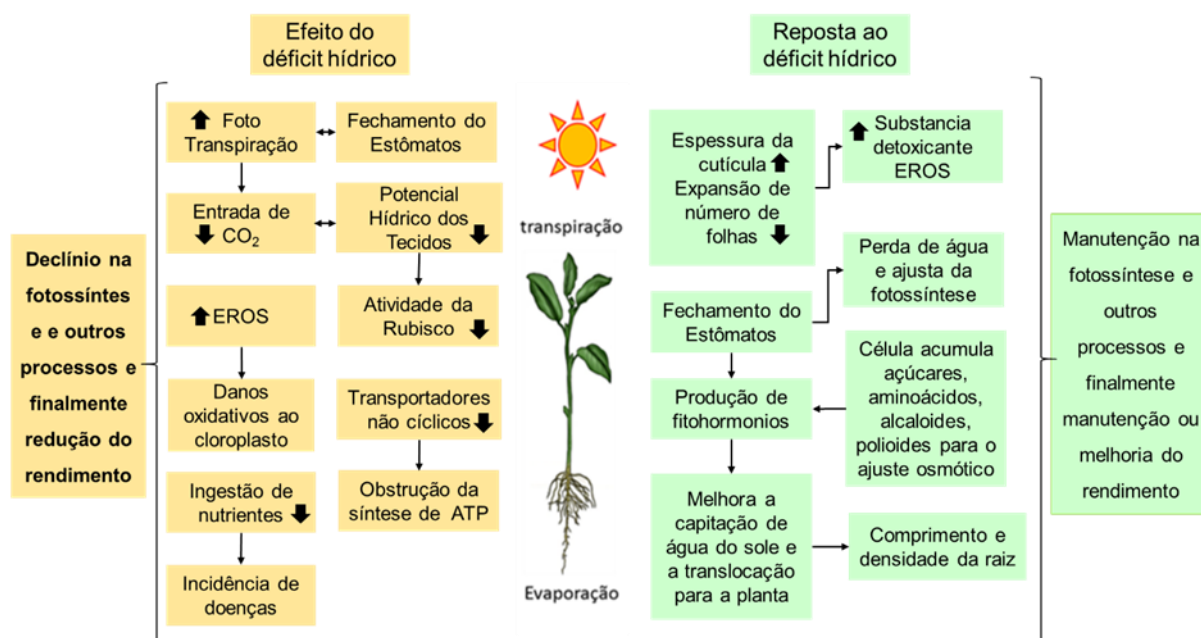


Figura 1. O déficit hídrico é um fator abiótico que desencadeia diversos problemas que afetam o desenvolvimento da planta, os efeitos começa pelo aumento da fototranspiração, fechamento dos estômatos e diminuição de CO₂ que irrompe na diminuição do potencial hídrico dos tecido folheares assim afetando os transportadores não cíclicos, síntese de ATP e atividades fotossintética, com a escassez de água tem um aumento na síntese de espécie reativa de oxigênio EROS que causa danos

oxidativo na planta. Durante o déficit hídrico a planta inicia diversos mecanismos morfofisiológicos de resposta; sendo a produção de substância detoxicante de EROS que diminuíram os danos causado pela oxidação, um aumento na espessura da cutícula, ajuste osmótico da celular, vias metabólicas que melhoram a captação de água pela raiz e ativação de genes que conferem tolerância (Adaptado de ILYAS et al., 2021).

As plantas evoluíram para desenvolver mecanismos abrangentes de sobrevivência, englobando além das respostas morfofisiológicas, respostas bioquímicas, celulares e moleculares (CHEN et al., 2017; PORNIRIWONG et al., 2017; ILYAS et al., 2021). As respostas moleculares envolvem genes que desempenham papéis cruciais em diversos mecanismos e podem ser categorizados em dois grandes grupos. O primeiro compreende proteínas funcionais que participam do metabolismo celular e contribuem para a tolerância, incluindo transportadores de água, enzimas de detoxificação, fatores de proteção de macromoléculas, como as proteínas LEA, proteases, e enzimas essenciais na biossíntese de osmólitos, açúcares e prolina (IRSIGLER et al., 2007). Esses elementos desempenham papéis essenciais na adaptação das plantas ao estresse hídrico.

O segundo grupo compreende as proteínas reguladoras, como os fatores de transcrição (DREB, AREB, MYC, MYB, NAC, e outros), fosfatases e quinases, genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e biossíntese do ABA. O ABA está presente em diversos processos bioquímicos, como dormência de sementes, desenvolvimento das plantas, abertura dos estômatos, morfogênese embrionária e síntese de lipídios e proteínas de armazenamento (ILYAS et al., 2021; ULLAH et al., 2017)

Em resposta às condições de estresse hídrico, o acúmulo de ABA é aumentado, principalmente na vasculatura das folhas, porque quase todas as enzimas da biossíntese de ABA são expressas em tecidos vasculares, e vários transportadores de ABA localizados na membrana celular são expressos predominantemente nos tecidos vasculares (TAKAHASHI et al., 2020).

O ácido jasmônico (JA) é um fitohormônio derivado do ácido α -linolênico envolvido no crescimento da planta, crescimento da raiz, amadurecimento do fruto, enrolamento da gavinha e produção de pólen viável (AHMAD et al., 2016, ULLAH et al., 2018). Durante o estresse fisiológico, o aumento na produção de JA

induz a tolerância à seca nas plantas de várias maneiras, incluindo fechamento estomático, eliminação de ERO e desenvolvimento radicular.

Semelhante ao ABA, vários estudos mostraram que os jasmonatos também participam da regulação do fechamento e da regulação dos estômatos em resposta ao estresse hídrico (RIEMANN et al., 2015). Esses genes reguladores atuam tanto na tolerância, como nas etapas iniciais de indução e regulação da expressão de genes, e na tradução de sinais em resposta ao déficit hídrico (IRSIGLER et al., 2007).

2.4 Fatores De Transcrição DREB e Edição Gênica

Os genes DREB (Dehydration Responsive Element Binding) pertence à família de genes caracterizada como um fator de transcrição (FT), ou seja, um gene que funciona como um regulador das respostas das plantas sob estresse. Os genes DREB são mais abundante na soja do que outras espécies. A análise do genoma da soja revelou 73 genes DREB subdivididos em seis subgrupos, sendo observado oito genes dentro de quatro pares de blocos sintênicos, sugerindo que os genes DREB passaram por eventos de duplicação (ZHOU et al., 2020).

Os FTs DREB1 são os principais reguladores da via de sinalização ao frio, enquanto os FTs DREB2 são expressos por vias de sinalização de seca, salinidade, metais pesados, estresse osmótico e temperatura (BAILLO et al., 2019). As vias de sinalização que os dois FTs seguem são separadas, porém são associadas à família de FTs de ligação do elemento responsivo ao etileno (ERF) (SINGH et al., 2021).

O FT DREB2 ativa a expressão de outros genes, através de proteínas de ligação ao elemento cis atuante responsivo a desidratação (DRE) presentes nos promotores dos genes (MIZOI et al., 2013). O elemento DRE possui a sequência conservada A/GCCGAC, que é encontrada nos promotores de diversos genes envolvidos na resposta ao frio, calor, desidratação e alta salinidade.

Os FTs DREB possuem a capacidade de controlar a expressão de diversos genes, contribuindo para uma maior capacidade de tolerância aos estresses ambientais nas plantas (TAN et al., 2015). A superexpressão dos FTs DREB aumentou a tolerância a altas temperaturas, baixas temperaturas, estresse salino e déficit hídrico em algumas plantas cultivadas como arroz, cana de açúcar, soja e milho (WANG et al., 2008; AUGUSTINE et al., 2015; MARINHO et al., 2022; IZADI-

DARBANDI et al., 2023). No entanto, para exercer sua função na resposta aos estresses abióticos, o FT DREB2A necessita de modificações pós-traducionais (LIU et al., 1998).

A deleção do domínio regulador negativo, uma região de 30 aminoácidos rica em serina e treonina adjacente ao domínio de ligação ERF de DREB2A é necessária para que seja constitutivamente ativo (QIN et al., 2008).

Algumas ligases RING E3 de subunidade única têm como alvo FT para degradação e, assim, regulam a expressão gênica em resposta a sinais ambientais ou hormonais. Estudos mostraram que as proteínas DRIP (DREB-Interacting Protein) funcionam como uma ubiquitina E3 ligase, permitindo a proteólise do FT DREB2A no proteossoma 26S e regulam negativamente os genes DREB2A (QIN et al., 2008).

As proteínas DRIP contêm um domínio C3HC4 RING e podem atuar como ligases de ubiquitina E3 que medeiam a ubiquitinação e degradação de DREB2 (Figura 2) (QIN et al., 2008). Isso indica que as proteínas DRIP são importantes reguladores negativos dos fatores de transcrição DREB2 e, portanto, das respostas mediadas por DREB2 a estresses abióticos.

Um estudo revelou que gene DRIP também apresenta uma regulação negativa controlada pela proteína TaSAP5 que atua como uma ubiquitina ligase E3 para mediar a degradação do DRIP e, assim, aumentar os níveis da proteína DREB2A. A superexpressão de TaSAP5 promoveu a redução da expressão dos genes DRIP e aumento dos níveis de DREB2A e aumento da tolerância a seca em *Arabidopsis* e trigo (ZHANG et al., 2017).

A via de regulação FT-DREB2A-DRIP identificada em *A. thaliana*, também parece estar presente em outras espécies, tais como em feijão caupi (SADHUKHAN et al., 2014) e trigo (ZHANG et al., 2017).

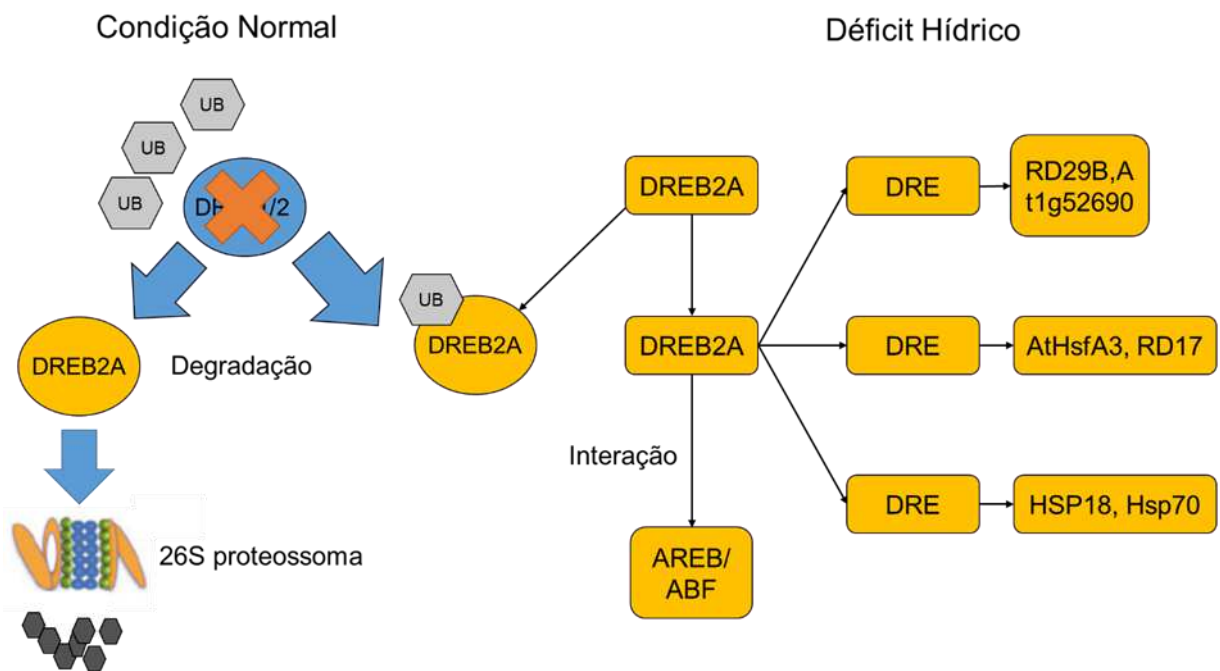


Figura 2. Quando a planta está em condições não estressantes o gene DREB2 está sendo expresso em baixos níveis, e acaba sendo submetido à via de degradação ubiquitinada pelas proteínas DRIP1 e DRIP2. A função dessas proteínas é marcar o gene DREB2, onde será levado para o proteossoma 26S onde ocorrerá a degradação desse gene. Em condições estressantes a planta começa a aumentar a expressão do gene DREB2 que vai iniciar uma cascata de resposta que confere tolerância a planta sob a condição estressante. Com o silenciamento das proteínas DRIPs ocorrerá um aumento na expressão do DREB2 em condições normais, assim conferindo a planta uma resposta rápida caso ocorra um estresse (REHMAN, 2015).

O conceito de "edição de genes" diz respeito a um procedimento que envolve a introdução de alterações específicas em uma região determinada do genoma, com o intuito de modificar os próprios genes da planta, sem a inserção de genes exógenos no genoma de interesse. Dessa forma, plantas que passam por essa edição genética podem ser classificadas como convencionais e não transgênicas (JANSING et al., 2019).

Uma das ferramentas empregadas para a edição gênica é o sistema CRISPR-Cas, que foi inicialmente identificado em bactérias e descrito como enzimas que associadas a um RNA-guia (gRNA) desempenham papel de defesa contra infecções ocasionadas por bacteriófagos. As nucleases Cas localizam e clivam o RNA viral através de uma sequência homóloga presente no gRNA (HILLE et al., 2018).

A edição baseada em CRISPR/CAS9 é uma manipulação precisa e simples, em plantas, esse método é baseado em duas moléculas principais, uma endonuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA). O gRNA é composto por duas pequenas moléculas de RNA, a saber, CRISPR RNA (crRNA, uma sequência de 20 nucleotídeos complementar ao DNA alvo) e crRNA transativador (tracrRNA), que atua como um andaime de ligação para a endonuclease Cas9. O reconhecimento do sítio alvo por Cas9 requer a presença de um motivo específico adjacente ao protoespaçador (PAM) flanqueando imediatamente o sítio alvo. A endonuclease Cas9 direcionada pelo gRNA promove a quebra da dupla fita de DNA, as quebras são posteriormente reparadas pelos mecanismos de reparo endógeno das células (BHOWMIK et al., 2021) (Figura 3).

O gRNA é um componente importante do sistema CRISPR/Cas9, pois determina a especificidade e eficácia da edição de genes (LIU et al., 2021). Uma grande preocupação é a presença de grandes famílias de genes em plantas e, portanto, alta similaridade de sequências, que pode permitir a ligação do gRNA fora da região de interesse, gerando efeitos adversos. Então é muito importante projetar um gRNA com alta especificidade no alvo e baixo potencial de ligação fora do alvo. Também é importante um protocolo eficiente para introduzir no genoma da planta os componentes de DNA/RNA, bem como, protocolo para regeneração de uma planta inteira (OSAKABE et al., 2018).

A tecnologia CRISPR/Cas tem sido usada de forma eficiente para a obtenção de plantas com tolerância a vários estresses abióticos, incluindo salinidade, alagamento e seca (SHI et al., 2017; ZHANG et al., 2019) dentre elas arroz (FENG et al., 2013; MIAO et al., 2013), trigo (SHAN et al., 2013), Arabidopsis e tabaco (LI et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013). Colocar estudo em soja

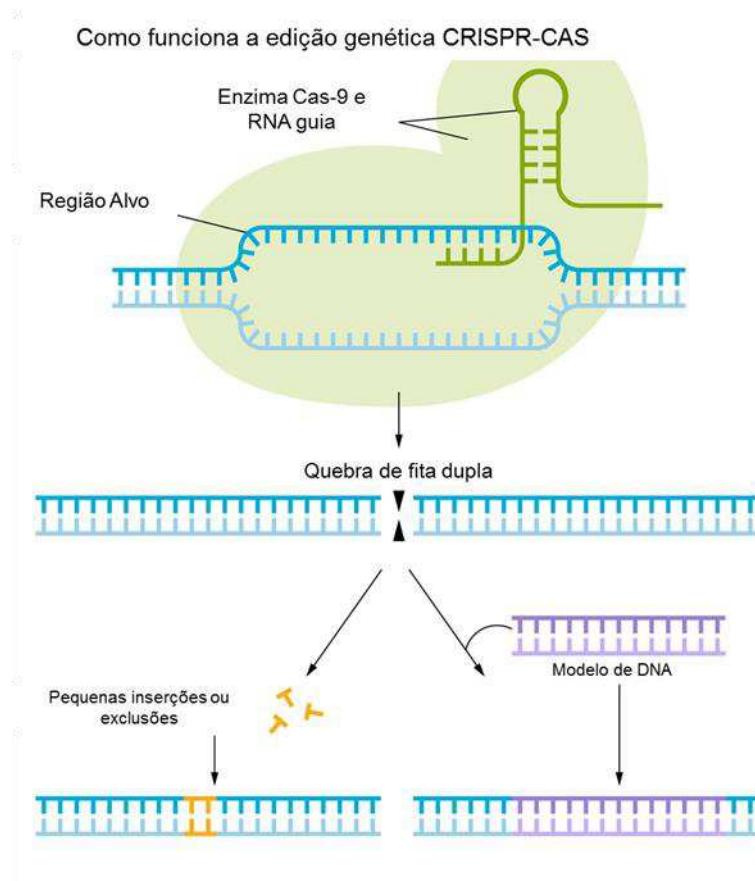


Figura 3: Mecanismos de Reparo do DNA: (A) Maquinaria CRISPR quebra a sequência de DNA e podem ocorrer 2 tipos de reparo: (NHEJ e HDR). No mecanismo de reparo independente de homologia (NHEJ) pode ocorrer duas situações: (B) Deleção da sequência e (C) Inserção de uma sequência mudando o frame de leitura. Já no reparo dependente de Homologia (HDR) é requerido a presença de um DNA molde, que serve como referência para o reparo de cada uma das fitas do DNA. Imagem: BARBOSA, D.A. (2022) baseado em SANDER; JOUNG, (2014).

2.5 Potássio e o Déficit Hídrico

Outra estratégia importante para responder às condições ambientais, é o equilíbrio na adubação, nesse sentido a adubação potássica tem grande importância, pois o potássio (K) é um dos principais macronutrientes requerido pela soja, porém é encontrado em baixas concentrações nos solos brasileiros (MOSTOFA et al., 2022).

O K é um cátion inorgânico encontrado no citoplasma e desempenha um papel essencial na atividade de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo primário. Sua contribuição é particularmente significativa para a regulação do turgor, um fator crucial em diversos processos vegetais (BLATT, 2016; COTELLE, 2016), tais como a função estomática, o crescimento do volume celular e

a integridade do contínuo citoplasma-membrana-parede celular (TAKAHASHI, 2016; LIU, 2015).

Para a fotossíntese, a função do íon K^+ está relacionada ao funcionamento normal dos estômatos e manutenção das condições do cloroplasto em relação ao turgor, pH e atividade de enzimas para a fixação fotossintética de CO_2 (JOHNSON et al., 2022). A deficiência de K^+ pode reduzir a taxa fotossintética devido a alterações na anatomia foliar, diminuindo a condutância do mesofilo. Isso pode resultar na diminuição da área de superfície do cloroplasto por unidade de área foliar, redução da condutividade estomática e diminuição do conteúdo de clorofila (LU et al., 2016; MARTINEAU et al., 2017).

É essencial manter concentrações de K acima de um limiar crítico nas folhas para garantir taxas estáveis de assimilação fotossintética de CO_2 . Abaixo desse requisito, ocorre uma queda drástica na assimilação fotossintética. Assim, a concentração tecidual de potássio é crucial para o funcionamento fotossintético eficiente das culturas (TRÄNKNER et al., 2018).

A deficiência de potássio resulta em redução da condutância estomática, aumento a resistência do mesofilo e diminuição da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) nas plantas, o que eventualmente diminuiu a taxa total de fotossíntese (A), que aumenta a produção de ROS da planta, acelerando o rápido dano fotooxidativo (WARAICH et al., 2012), além disso, o desempenho do K está na regulação da abertura estomática que é equilibrar a entrada de CO_2 e a remoção de vapor de H_2O dos espaços intercelulares (RAWAT et al., 2022).

O envolvimento do potássio na regulação estomática está relacionado na regulação do turgor dentro das células-guarda durante o movimento estomático, uma das funções do estômatos é controlar a perda de água da planta via transpiração, durante a escassez de água, o fechamento dos estômatos é seguido por uma rápida liberação de K das células-guarda para o apoplasto, o que impede que os estômatos permaneçam abertos com suprimentos insuficientes do nutriente (Figura 4) (WANG et al., 2013).

Os eventos que promovem as atividades estomáticas quando a luz irradia para a célula vegetal e estimulam a abertura estomática; a ativação da bomba de prótons ATPase, que ajuda a absorver potássio e seus ânions associados, como Cl^- e malato, e a absorção de soluto e síntese de soluto orgânico, com o aumento da

quantidade de soluto e sacarose nos vacúolos da célula-guarda, eventualmente diminuem o potencial osmótico (HASANUZZAMAN et al., 2018).

A entrada e saída de potássio normalmente está em equilíbrio em plantas que recebem o fornecimento de K, no entanto, o crescimento da planta é limitado na falta, isso ocorre devido ao fluxo excessivo de potássio causado pelo aumento da permeabilidade da membrana celular e pode aumentar o potencial de água do citoplasma e diminuir a absorção de água da planta (WEI et al. 2013).

A deficiência interna de potássio pode resultar na diminuição de atividades enzimáticas dependentes do nutriente e perturbar o metabolismo fisiológico da planta (MARSCHNER, 2012). Além disso, na carência frequentemente desencadeia vias de sinalização celular sobrepostas e respostas celulares, incluindo a redução da produção de clorofila e da capacidade fotossintética (RAZA et al., 2013).

A deficiência hídrica pode aumentar a permeabilidade da membrana celular, levando à saída de K da célula, o que pode perturbar o metabolismo da planta e limitar seu crescimento (WEI et al., 2013). Nessas condições, o potássio induz tolerância à seca regulando a pressão osmótica e de turgescência (ZAHOOR et al., 2017). Além disso, mantém um equilíbrio entre antioxidantes endógenos e a produção de radicais livres (WARAICH et al., 2011). Uma quantidade equilibrada de K é crucial para manter a saúde das plantas, mesmo em condições de escassez de água, e assegura um rendimento e qualidade adequados dos produtos.

Além disso, a aplicação de potássio apresenta efeitos positivos no pH do solo, teor de fósforo disponível e índice de diversidade microbiana. Também está envolvido na melhoria do sistema radicular sob déficit hídrico. Em canola (*Brassica napus* L.), a aplicação em condições de déficit hídrico resultou em alongamento do comprimento da raiz, aumento da densidade radicular e equilíbrio na relação raiz-parte aérea para aumentar a absorção de água. Além disso, estimulou a secreção de ácidos orgânicos, contribuindo para aprimorar a aquisição e utilização de nutrientes (XU et al., 2021).

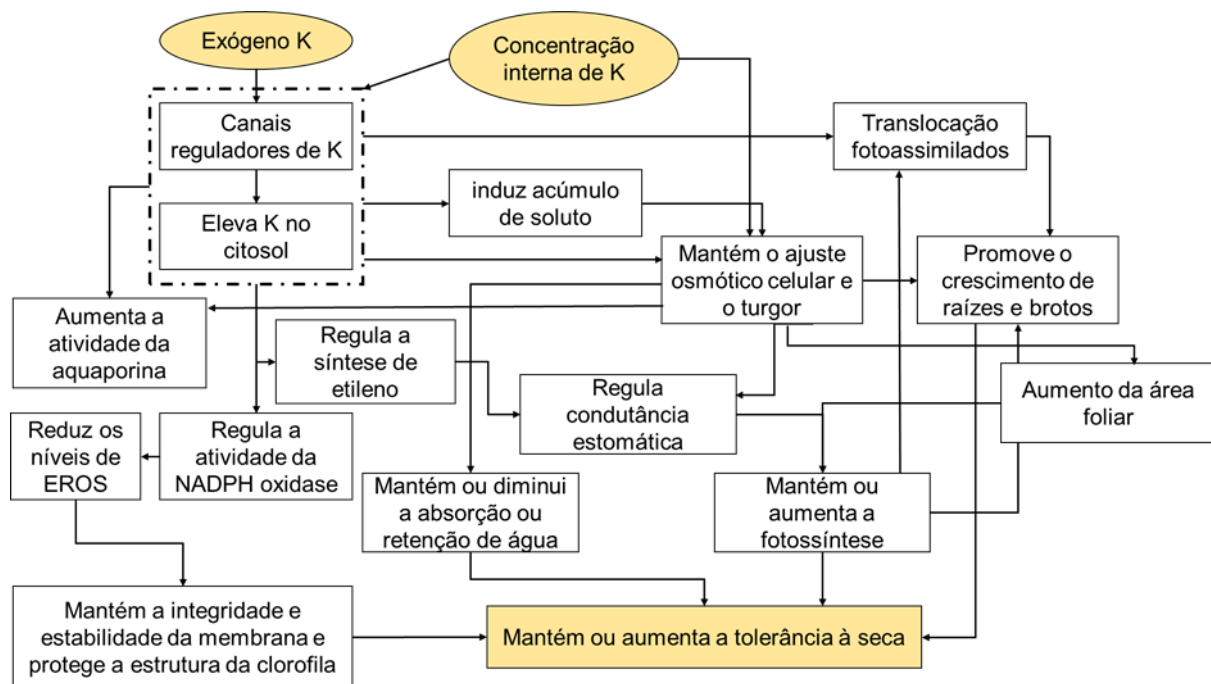


Figura 4. Durante o déficit hídrico o potássio inicia uma via de resposta que atua na tolerância da planta. Esse processo pode ser realizado com potássio exógeno ou concentração interna de K, essa cascata desencadeia a ativação dos canais reguladores de K que elevaram a concentração no citosol de íons de K e assim induzir o acúmulo de soluto e translocação dos fotoassimilados que mantaram o ajuste osmótico, turgor, condutância estomática e fotossintético, a regulação da NADPH que reduzira os níveis de espécie reativa de oxigênio (EROS), essa via metabólica promovera o crescimento de raiz, broto e aumento de área foliar. Todos esses vias que o potássio percorre acabam mantendo ou aumentando a tolerância da planta ao déficit hídrico (Wang et al., 2013).

2.6 Objetivo e Objetivo Especifico

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do silenciamento do gene DRIP em soja e da adubação potássica sob condições de déficit hídrico.

O objetivo específico foi Identificar linhagens homozigotas de soja editadas para silenciamento da proteína DRIP;

Determinar a expressão dos genes DREB2 e DRIP em condição de déficit hídrico;

Demonstrar através de análises de componentes de produção da soja a relação entre o silenciamento da proteína DRIP, a adubação potássica e o rendimento;

Demonstrar através da análise de parâmetros morfológico das raízes o efeito da adubação potássica e do silenciamento da proteína DRIP na arquitetura radicular;

Determinar através da análise de óleo e proteína o efeito das condições avaliadas nos componentes nutricionais da soja;

Determinar a melhor condição de adubação potássica para as linhagens de soja editadas para silenciamento da proteína DRIP

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção Da Cultivar Editada

A transformação de embriões de soja das cultivares convencionais BRS 537, BMX Potência e BRS 283 foi conduzida de acordo com o protocolo estabelecido por Kanamori et al. (2011), com uma modificação: a injúria foi aplicada não apenas na região apical, mas em todo o embrião, visando aumentar a probabilidade de células transformadas.

Após o procedimento de injúria, os embriões foram incubados por 5 dias em meio sólido CCM, composto por Gamborg B5 Basal Medium 1/10X, Vitamina B5 1/10X, sacarose 30g/L, MES 4,62 g/L, phytaagar 4 g/L, suplementado com BAP 1,67mg/L, GA3 0,25mg/L, AS 1 M, STS (Tiosulfato de sódio, 1M, 1% de DTT 1M e CYS 400 mg/L, pH 5,4). Posteriormente, os embriões foram agrupados em 3 bulks contendo 15 embriões cada. O DNA total foi extraído seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990), e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v). Para identificar a presença de células transformadas, foi realizada uma PCR convencional utilizando os primers U6cloning, os quais confirmam a presença do promotor Ubiquitina 6 da maquinaria Cas9, presente no vetor de transformação.

3.1 Seleção De Linhagem Homozigota

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Soja, localizada no município de Londrina, Estado do Paraná. Inicialmente, foram semeadas 245 sementes T1 da cultivar BMX Potência RR, editadas para o silenciamento dos genes DRIP (Glyma.19G161700 e Glyma.03G159500). Os experimentos envolveram análises moleculares para selecionar linhagens homozigotas de plantas de soja editadas, livres da maquinaria Cas9. Isso foi realizado por meio de três etapas de

PCR: uma para identificar a ausência da maquinaria Cas9, outra para gerar fragmentos de DNA específicos de cada gene editado e uma terceira para preparar os fragmentos de DNA para sequenciamento subsequente. Essas análises garantiram a identificação precisa das linhagens desejadas.

O processo de extração de DNA seguiu o protocolo Doyle-Doyle (1990), e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o DNA foi submetido a PCR utilizando primers específicos para detecção da presença da nucleasse Cas9 (Tabela 1), constituídas de: 50 ng de DNA molde, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,15 mM de dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase e 0,4 µM de cada um dos primers, em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Tabela 1. Primers específicos para seleção de linhas homozigotas sem maquinaria Cas9.

ID primer	Sequência	Alvo de amplificação
Cas9-F6	ACTCCAGAATGAGAAGCTGT	Cas9
Cas9-R6	CCTTGTAAGTCACCATACACG	
ED2-DRIP-GM03-F5	CTACCATTACCAACACCTC	Glyma.03G159500
ED-DRIP_Gm03-R	GATTGAAGCTGTGTTTTACT	
ED2-DRIP-GM19-F5	ATTCCCTATTATCATCCATC	Glyma.19G161700
ED2-DRIP-GM19-R1	AGTCCACAACAACAGAAC	

As plantas que não apresentaram amplificação e, portanto não possuíam a maquinaria Cas, foram selecionadas para o sequenciamento para confirmar a homozigose da edição. Então, foi realizada nova PCR com primers específicos para a edição promovida em cada glyma (Tabela 1) seguindo as mesmas condições descritas acima. O DNA amplificado passou por purificação utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento de DNA purificado foi utilizado nas reações de amplificação para o sequenciamento. A reação foi preparada em volume final de 20 µL composta por 3 µL do produto de PCR purificado, 0,32 pmol dos mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR convencional separadamente (Tabela 1), e o master mix do kit Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. A ciclagem utilizada foi composta por desnaturação

inicial de 94°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15s, 50°C por 15s e 72°C por 4 min. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado por precipitação alcoólica e ressuspendido em 10 µL de Hi-Di Formamida (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram então, desnaturadas por 5 minutos a 95 oC e imediatamente resfriadas em gelo. A separação dos fragmentos foi realizada em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3500 (Applied Biosystems).

Os dados obtidos do sequenciamento foram analisados no software ICE para identificar plantas homozigotas para edição nos dois glymas. Uma planta foi selecionada para condução dos experimentos de déficit hídrico e trocas gasosas.

3.2 Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas

Após a obtenção da cultivar BMX Potência RR não transgênica e homozigota foi realizado o experimento que validaria o silenciamento dos genes DRIP (Glyma.19G161700 e Glyma.03G159500) e o efeito do potássio nessa interação.

O experimento contemplou duas condições hídricas distintas (controle e déficit hídrico), cinco doses variadas de potássio (0, 50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹, fonte: KCl, 60% de K₂O) e duas cultivares (convencional e editado). O delineamento experimental adotado foi em delineamento inteiramente casualizado 2 × 2 × 2 × 5, com seis repetições. O substrato utilizado consistiu em uma mistura de solo e areia na proporção (2:1), cujos atributos químicos estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades químicas do solo utilizado para condução do experimento

pH em CaCl ₂	5,98
Acidez Potencial (H+Al)	2,47 cmolc dm ⁻³
Matéria Orgânica (MO)	24,49 g/dm ³
CTC (pH7)	28,35 cmolc dm ⁻³
CTC (Efetiva)	25,88 cmolc dm ⁻³
Potássio (K ⁺)	1,12 cmolc dm ⁻³
Cálcio (Ca ²⁺)	1,12 cmolc dm ⁻³
Magnésio (Mg ²⁺)	4,08 cmolc dm ⁻³
Sódio (Na ⁺)	4,08 cmolc dm ⁻³
Fósforo Mehlich 1	4,08 cmolc dm ⁻³
Fosforo Mehlich 3	446,46 mg dm ⁻³
Saturação por Base (V%)	91,28%

Sementes da linhagem de soja editadas e da cultivar convencional foram germinadas em papel Germitest®, de acordo com as regras para análise de sementes. Plântulas com radícula uniforme foram tratadas com inoculante *Bradyrhizobium japonicum* (Atmo®), $5,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ e transplantadas para vasos e mantidas sob condição hídrica favorável até o estágio de desenvolvimento V3 para as avaliações no estágio vegetativo e R3 para as avaliações no estágio reprodutivo.

A adubação potássica nas 4 concentrações avaliadas (50, 100, 200 e 400 mg kg⁻¹, fonte: KCl, 60% de K₂O) foi aplicada aos vasos tanto para o experimento no estágio vegetativo quanto para o reprodutivo em duas etapas para evitar toxidez nas concentrações maiores de sal. Quando as plantas estavam em estágio de desenvolvimento V1 foi aplicado 50% da concentração e o restante quando as plantas estavam em estágio de desenvolvimento V2.

Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V3 os vasos foram ensacados, e a irrigação foi interrompida para o tratamento de déficit hídrico no estágio vegetativo, enquanto as plantas do tratamento controle continuaram a ser irrigadas. O mesmo procedimento foi realizado no estágio R3 para as plantas avaliadas no estágio vegetativo.

O estado hídrico das plantas foi monitorado por meio da leitura da condutância estomática (gs), sendo consideradas sob déficit hídrico quando gs fosse inferior a 0,2 mol H₂O m⁻² s⁻¹, conforme descrito por Flexas et al. (2004) e Salinet et al. (2009). Adicionalmente, foram realizadas medições da taxa fotossintética (A), concentração interna de CO₂ (C_i), taxa de transpiração (E) e temperatura foliar por meio de um analisador portátil de fotossíntese modelo LCpro-SD (Li-6400).

Quando as plantas atingiram o déficit hídrico, foram coletadas folhas para a extração de RNA e análise de expressão gênica. Após esse período, as plantas foram re-hidratadas e mantidas em casa de vegetação até o final do ciclo.

3.3 Determinação Componentes De Produção e Qualidade Nutricional

Após o estágio de maturação fisiológica (R8), foram avaliados os componentes de produção, incluindo peso de grãos (PG), número de vagens (NV), número de grãos por vagem (NGV) e peso de 100 sementes (P100). Além disso, foi realizado o levantamento do componente morfológico das raízes, especificamente a massa seca de raízes (g por vaso).

Os teores de óleo e proteína nos grãos foram quantificados por meio da técnica da Espectroscopia na Região do Infravermelho (NIR), que abrange uma varredura entre 1100 a 2500 nanômetros (nm). O NIR é uma técnica analítica que utiliza a radiação infravermelha para determinar a composição química de uma amostra. Ela mede a absorção da luz em diferentes comprimentos de onda, gerando um espectro característico que permite identificar e quantificar os constituintes presentes na amostra (Tibola et al. 2018).

3.4 Extração Do RNA e Reação De RT-QPCR

O RNA total foi extraído das amostras de folhas de soja utilizando o reagente Trizol®, conforme as orientações do fabricante. Após a extração, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) para eliminar possíveis resíduos de DNA. Em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit Superscript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram conduzidas com o kit Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as orientações do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada em triplicata biológica e técnica (n = 9) em um termociclador 7900HT (Applied Biosystems). As reações consistiram em cDNAs, primers F e R a 0,2 µM e 1x tampão de reação Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). O protocolo de ciclagem incluiu um período de incubação a 50°C por 2 min, seguido por um ciclo de desnaturação a 95°C por 2 min, 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 s e 60°C por 60 s, e uma etapa de curva de melting a 95°C por 15 s, 60°C por 15 s e 95°C por 15 s. A normalização da expressão gênica foi realizada utilizando os genes da β-actina (Glyma.15G050200 – primer F 5'-GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3'/ primer R 5'CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3' e Fyve (Glyma.13G114700 – primer F 5'TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG3'/ primer R 5'GATCCCTCATCCATACATTTTCAG3') (Tabela 3) definidos como genes referências para soja (MARCOLINO-GOMES et al., 2015). A expressão foi determinada através da fórmula Log2FC, adaptada de acordo com as eficiências dos primers (PFAFFL, 2001).

Tabela 3. Sequências de primers forward (F) e reverse (R) desenhados para os genes GmDRIP e GmDREB2A, a serem utilizados na quantificação de expressão gênica via RT-qPCR.

Gene	Sequência	Primers - Sequência 5'- 3'	Amplicon	Eficiências %
<i>GmDRIP</i>	Glyma.03G159500	F-CACCGTGAAGGATACTGGATA	82	98
		R-TGAGCATTACAGCGACTACC		
	Glyma.19G161700	F-GCCTGGTTAGAAGTTTGTGAG	107	87
		R-GTTTGCATTTGTTGGCTATTGG		
	Glyma.02G141500	F-CTGTTCTGTTGGTCATTGTAGTG	96	88
		R-ATCCAAGAAACCATCTGTAGCA		
	Glyma.10G032500	F-AATCGAAAACCTTCCCAGAA	104	95
		R-TCTAGCAGGAGAGGAGATTT		
DREB2A	Glyma.14G056200	F-TGATGAGTCTGCGTTGATGC R-TCCCAACAACCTTGGCATCTG	133	97

3.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análises, onde foram realizadas verificações de normalidade e homogeneidade dos dados por meio de testes como Shapiro-Wilk e Hartley. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para comparar médias entre tratamentos, revelando possíveis diferenças significativas. Posteriormente, o teste de Tukey foi utilizado para realizar comparações detalhadas entre as médias, identificando tratamentos distintos. Todas as análises foram conduzidas com um nível de significância de 5% no software R.

4 Resultados

4.1 Seleção Linhagem Homozigotas

O sistema CRISPR/Cas foi inserido no genoma de uma variedade convencional de soja por meio de um vetor, o qual foi removido nas gerações seguintes através de segregação mendeliana por meio do avanço de geração por autofecundação. Testes moleculares de reação da polimerase em cadeia (PCR) seguido de sequenciamento foram utilizados para identificar as plantas que não herdaram os elementos genéticos do vetor CRISPR/Cas, mas que herdaram o gene com a mutação desejada.

Para avaliar o efeito da edição na resposta ao déficit hídrico é necessário que a planta esteja em homozigose, para que não haja segregação entre os indivíduos ou variação no nível de expressão do gene em estudo, que afetaria os resultados observados.

Na Figura 5A a presença de amplificação da planta editada T0 indica presença da maquinaria Cas9, enquanto ausência de amplificação nas linhas editadas T1 evidencia a ausência da maquinaria. No Glyma.03G159500 a edição obtida foi a deleção de quatro bases, enquanto no Glyma.19G161700 ocorreu a deleção de 10 bases, e o sequenciamento da linha editada na geração T1 apresentou 100% de edição, portanto a linhagem está em homozigose para os genes editados (Figura 4C).

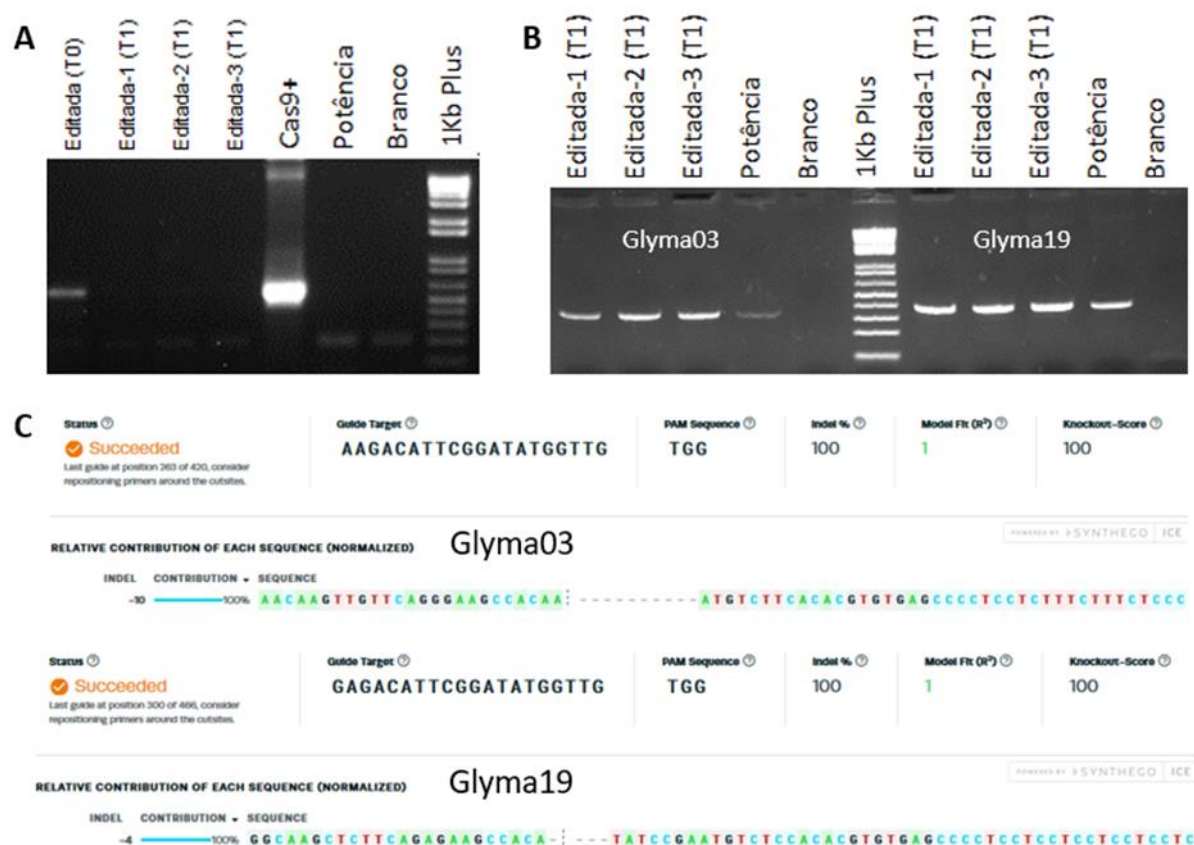


Figura 5. Análises moleculares para determinação de linha editada homozigota sem maquinaria Cas9. Em A resolução da PCR para a ausência de Cas9. Em B amplificação dos glymas DRIP editados. Em C análise do sequenciamento demonstrando homozigose dos genes DRIP editados.

4.2 Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas No Estádio Vegetativo

Não foram observadas diferenças nos dados de fotossíntese (A) e condutância estomática (Gs) entre a cultivar BMX Potência RR com edição genética

e sem edição, sob as duas condições estabelecidas (Gráfico 1A e C). No entanto, destaca-se que houve significância nos valores de concentração intercelular de CO₂ (Ci) para a cultivar sem edição, especificamente na dose de 50 mg/kg de potássio, (Gráfico 1B).

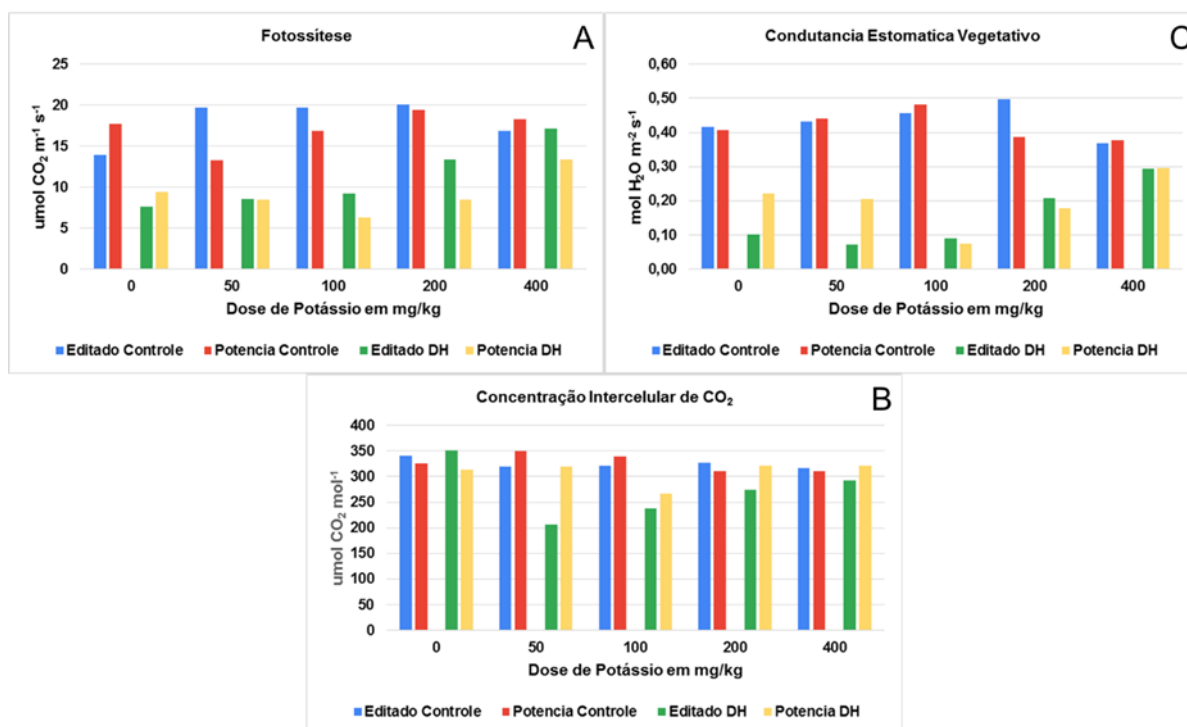


Gráfico 1. Análises de trocas gasosas no estágio vegetativo em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição em experimento realizado em casa de vegetação. Os gráficos representam os valores de Fotossíntese (A), Condutância estomática (Gs) e Concentração intercelular de CO₂ (Ci) amostrados em plantas de soja sob déficit (DH) e controle. Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada).

Na condição de DH sem a presença de potássio, a cultivar BMX Potência RR editada, foi significativamente melhor em comparação com a cultivar sem edição. Além disso, na condição de controle e com a dose de 100 mg/kg de K, a cultivar com edição mostrou ser superior (Gráfico 2A). Em peso de raiz não foi observado significância entre as cultivares, mas teve uma tendência em relação a doses de potássio (Gráfico 2B).

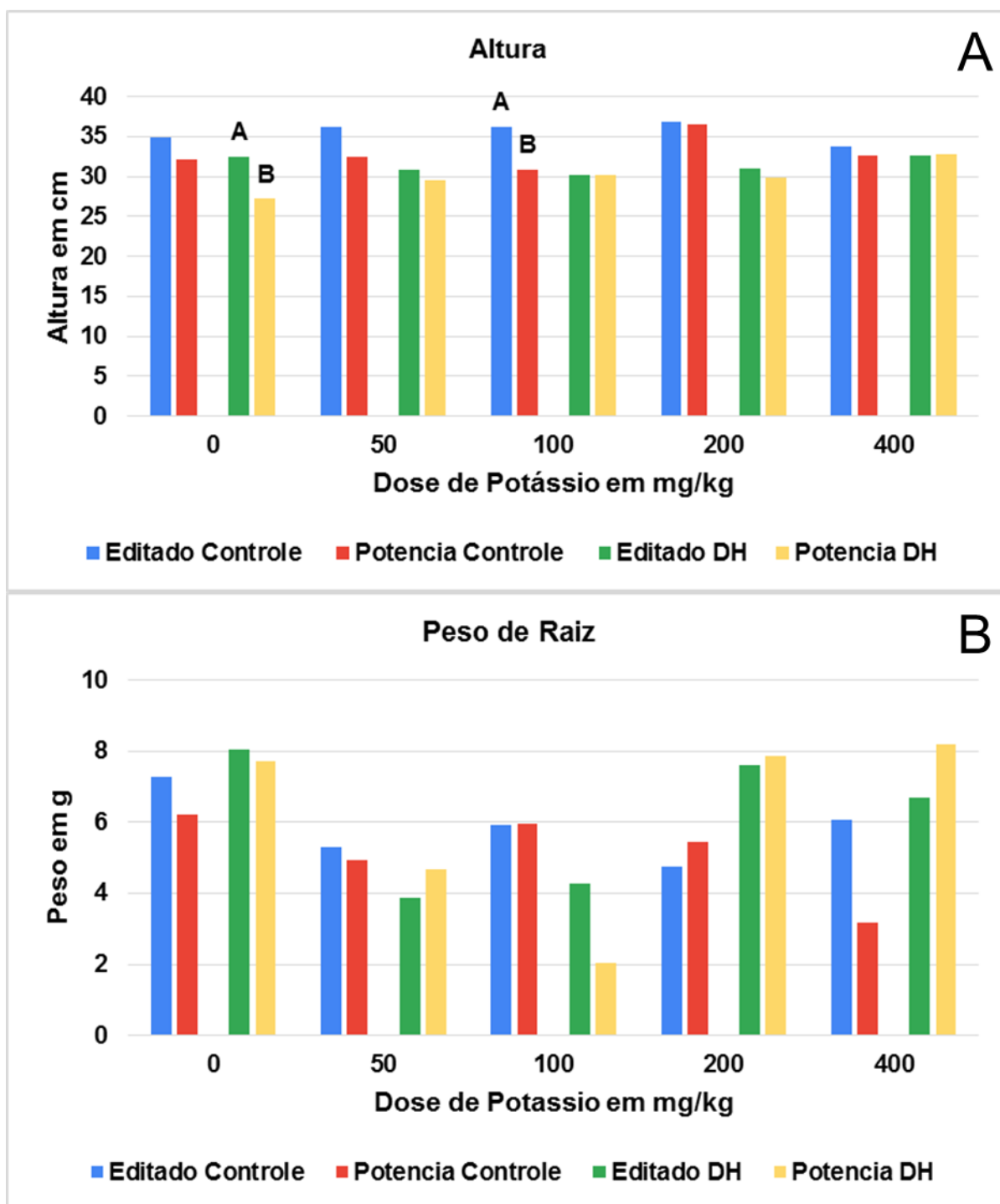


Gráfico 2. Altura das plantas e peso de raiz no estágio vegetativo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle. Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)

4.3 Determinação Componentes De Produção e Teor De Nutrientes Do Grão

Em relação aos componentes de produção, as plantas editadas que estavam sob a condição controle mostraram resultados superiores na produtividade de vagens (PV), sementes (PS) e peso total de sementes (PTS) para as doses de 0, 50 e 400 mg/kg de K (Gráfico 3). No entanto, o peso de 100 sementes não apresentou diferença entre as cultivares (Gráfico 3C).

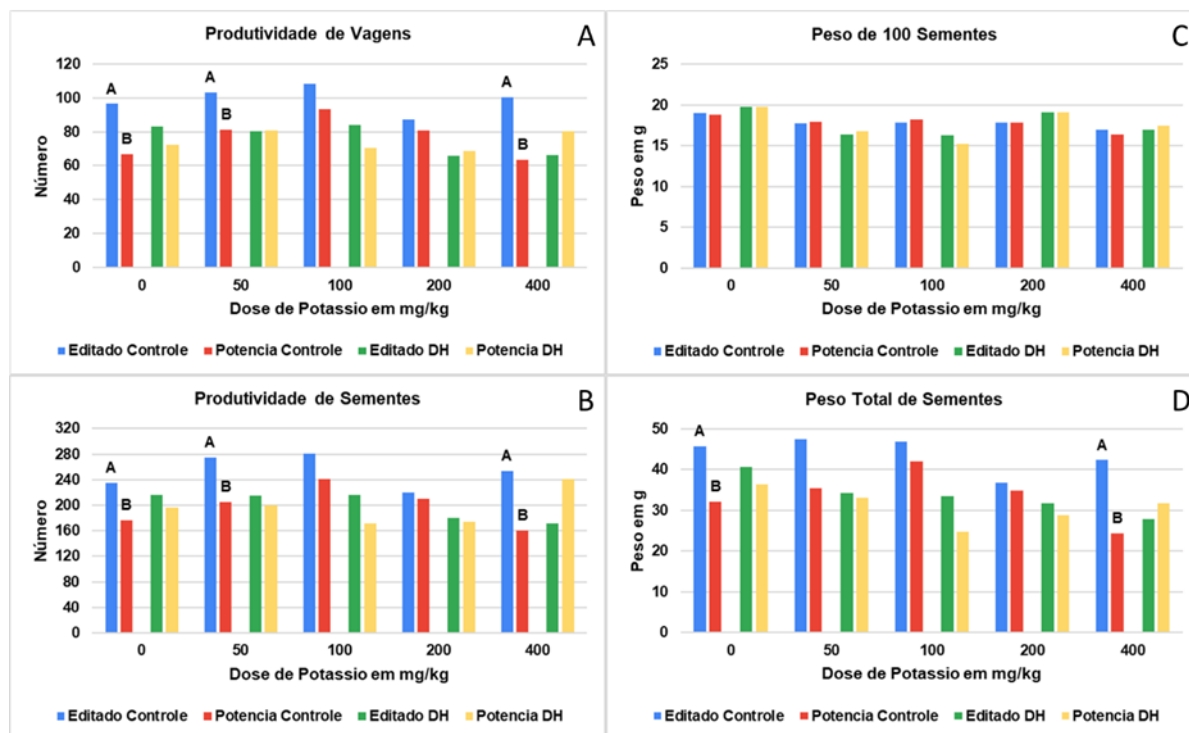


Gráfico 3: Componentes de produtividade das plantas no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle. Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR sem e editada).

Na dose de 50 mg/kg de potássio, a planta editada sob condição controle apresentou significância em relação a cultivar BMX Potência RR para o teor de óleo (Gráfico 4A). Além disso, no teor de proteína, houve significância para a cultivar editada sob condição de controle na dose de 200 mg/kg de K (Gráfico 4B).

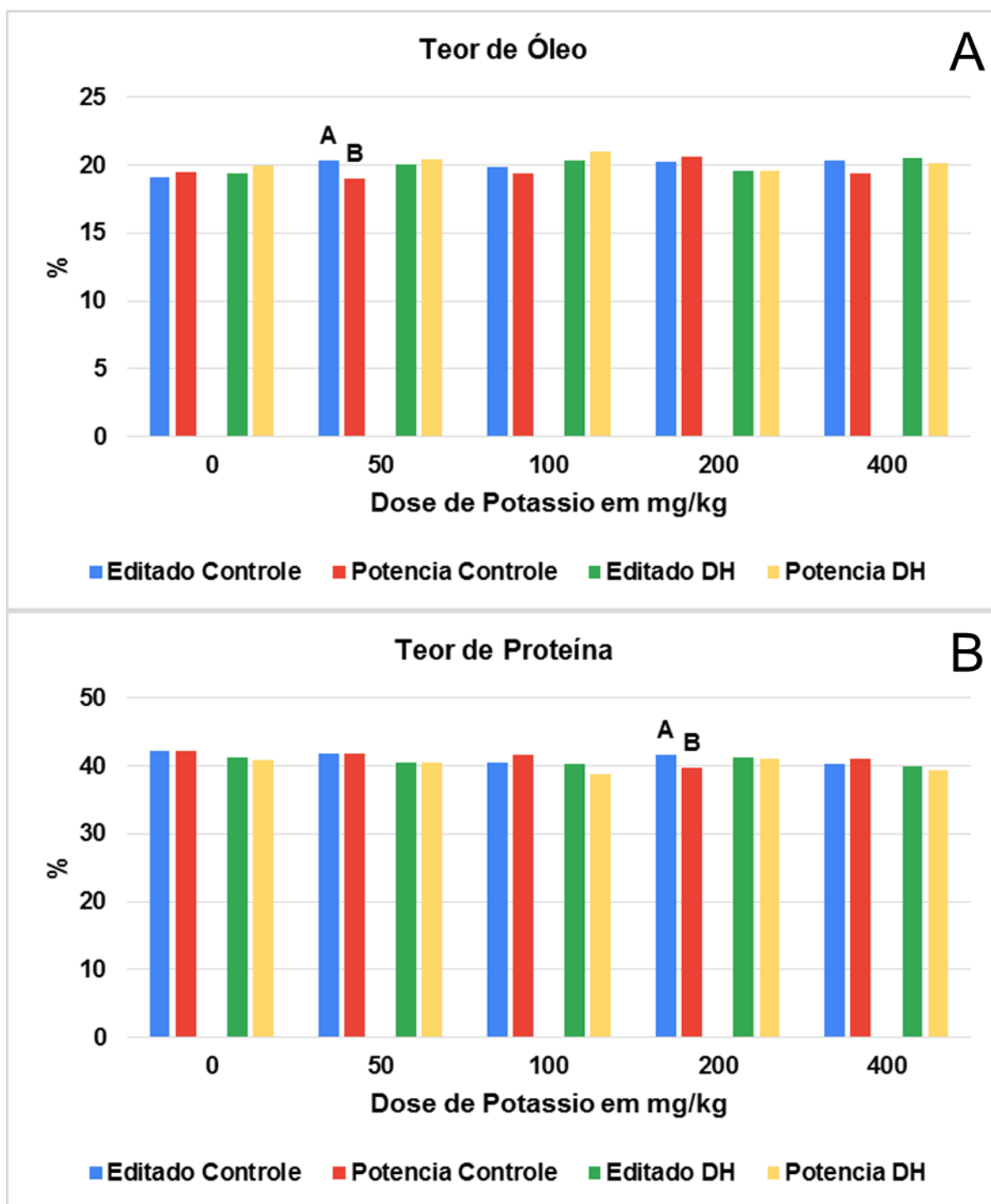


Gráfico 4: Componentes nutricionais (óleo e proteína) das plantas no estágio vegetativo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle. As letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR e Linha Editada)

Na análise dos teores de ácidos graxos, observaram-se diferenças significativas entre as cultivares BMX Potência RR e a cultivar editada. No que se

refere ao teor de ácido palmítico, a cultivar BMX Potência RR demonstrou significância em comparação com a cultivar editada, sendo esse padrão mantido em diversas concentrações de potássio, incluindo 0, 50, 200 e 400 mg/kg (Gráfico 5A).

Quanto aos teores de ácido esteárico, a cultivar BMX Potência RR apresentou predominância na dose sem o potássio, destacando-se como a cultivar mais significativa nesse contexto específico (Gráfico 5B). Já nos teores de ácido oleico, a cultivar editada revelou-se significativa em relação a cultivar BMX Potência RR nas duas condições distintas (controle e DH) e nas doses de 0 e 200 mg/kg de K (Gráfico 5C). No teor de ácido linolênico, observou-se significância na dose de 400 mg/kg para a cultivar BMX Potência RR, especialmente quando submetida à condição de déficit hídrico (Gráfico 5E).

Em relação ao teor linoleico, a cultivar BMX Potência RR demonstrou significância nas doses de 50 e 200 mg/kg de K. Sem a presença de potássio a cultivar editada sob déficit hídrico se destacou como significativa nessa variável (Gráfico 5D).

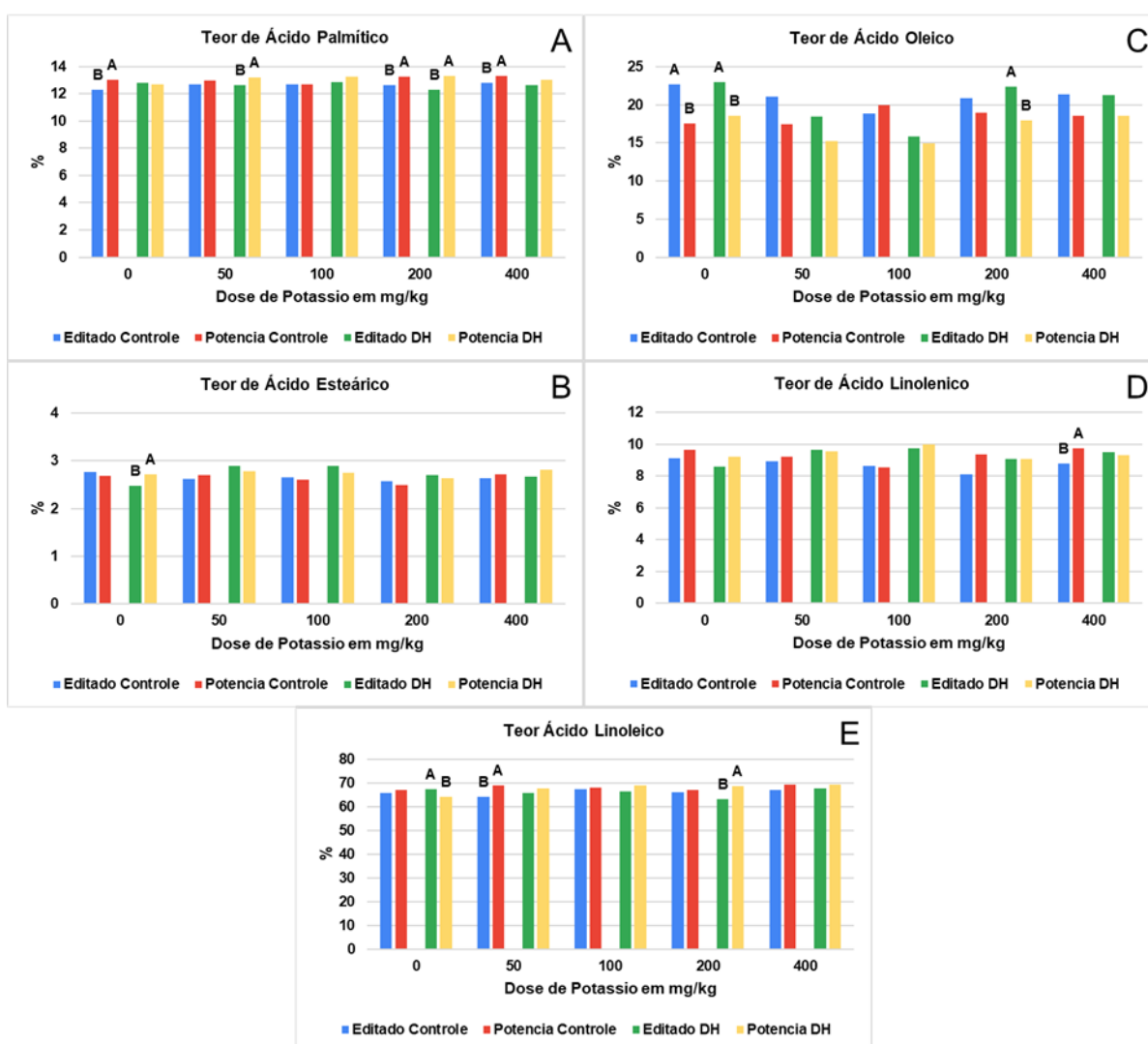


Gráfico 5: Teores de ácidos graxos nos grãos de soja das plantas no estágio vegetativo, em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle. Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)

4.4 Análise De Expressão Gênica No Estágio Vegetativo

Em folhas de soja foi observado que a expressão dos genes Gm03g159500 e Gm19g161700 que foram editados apresentaram uma expressão gênica maior que os genes Gm02g141500 e Gm10g032500 que não foram editados, o gene DREB2A apresentou uma alta expressão na planta editada (Gráfico 6).

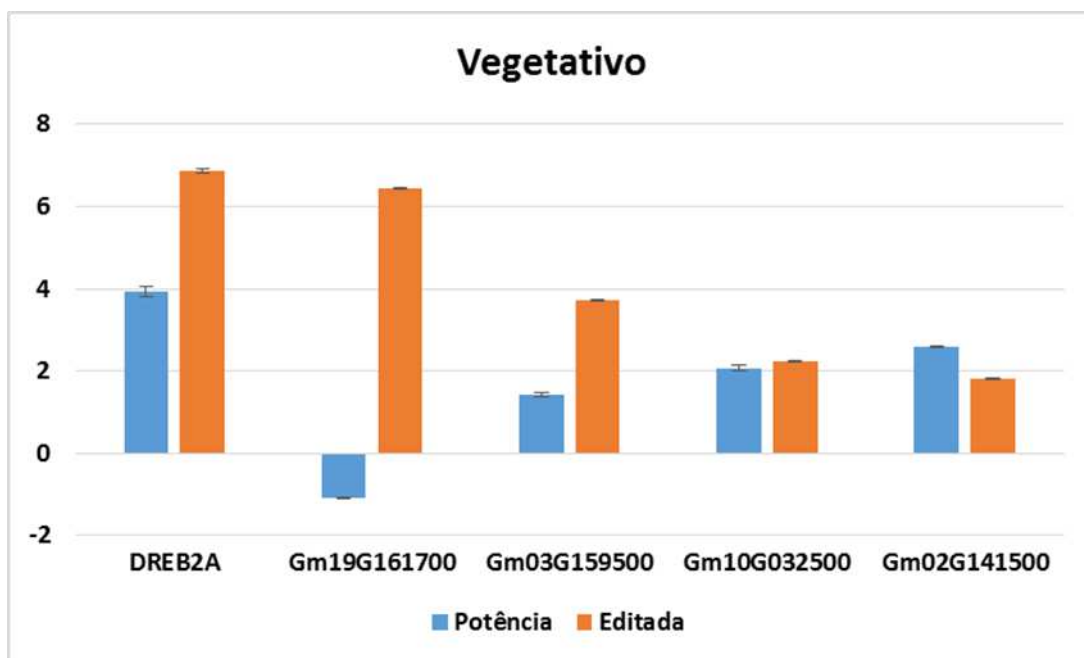


Gráfico 6: Expressão gênica em folhas de soja das plantas no estágio vegetativo, em experimento realizado em casa de vegetação amostradas em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição.

4.5 Experimento De Déficit Hídrico e Trocas Gasosas Reprodutivo

Os resultados das análises das variáveis fisiológicas, incluindo fotossíntese (A), condutância estomática (Gs) e concentração intercelular de CO₂ (Ci), revelaram que não houve diferenças significativas entre a Cultivar BMX Potência RR com edição e sem edição gênica, independentemente das doses de potássio avaliadas (Gráfico 7).

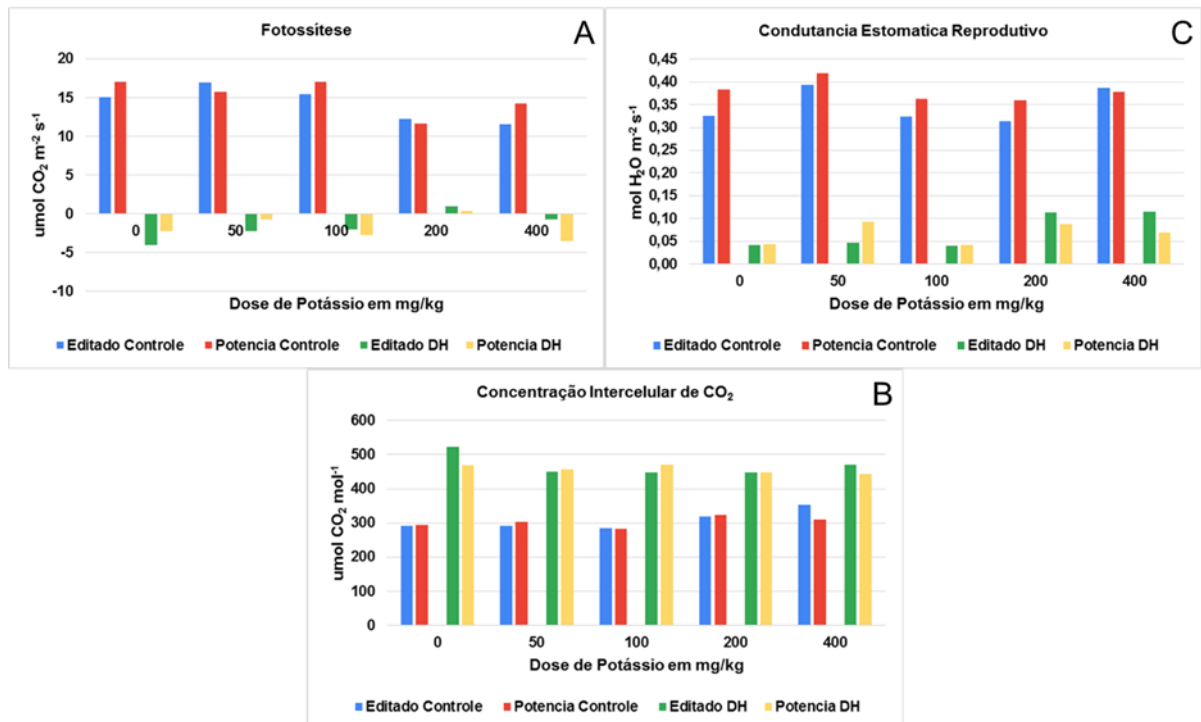


Gráfico 7: Análises de trocas gasosas no estágio reprodutivo em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição em experimento realizado em casa de vegetação. Os gráficos representam os valores de Fotossíntese (A), Condutância estomática (Gs) e Concentração intercelular de CO₂ (Ci) amostrados em plantas de soja sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)

Em relação à altura das plantas, observou-se significância para a cultivar editada em ambas as condições controle e DH nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg de K (Gráfico 8A). No que diz respeito ao peso de raízes, a cultivar editada demonstrou efeitos significativos do potássio nas concentrações de 50 e 100 mg/kg de K, além de evidenciar um efeito do gene na dose de 400 mg/kg de K (Gráfico 8B).

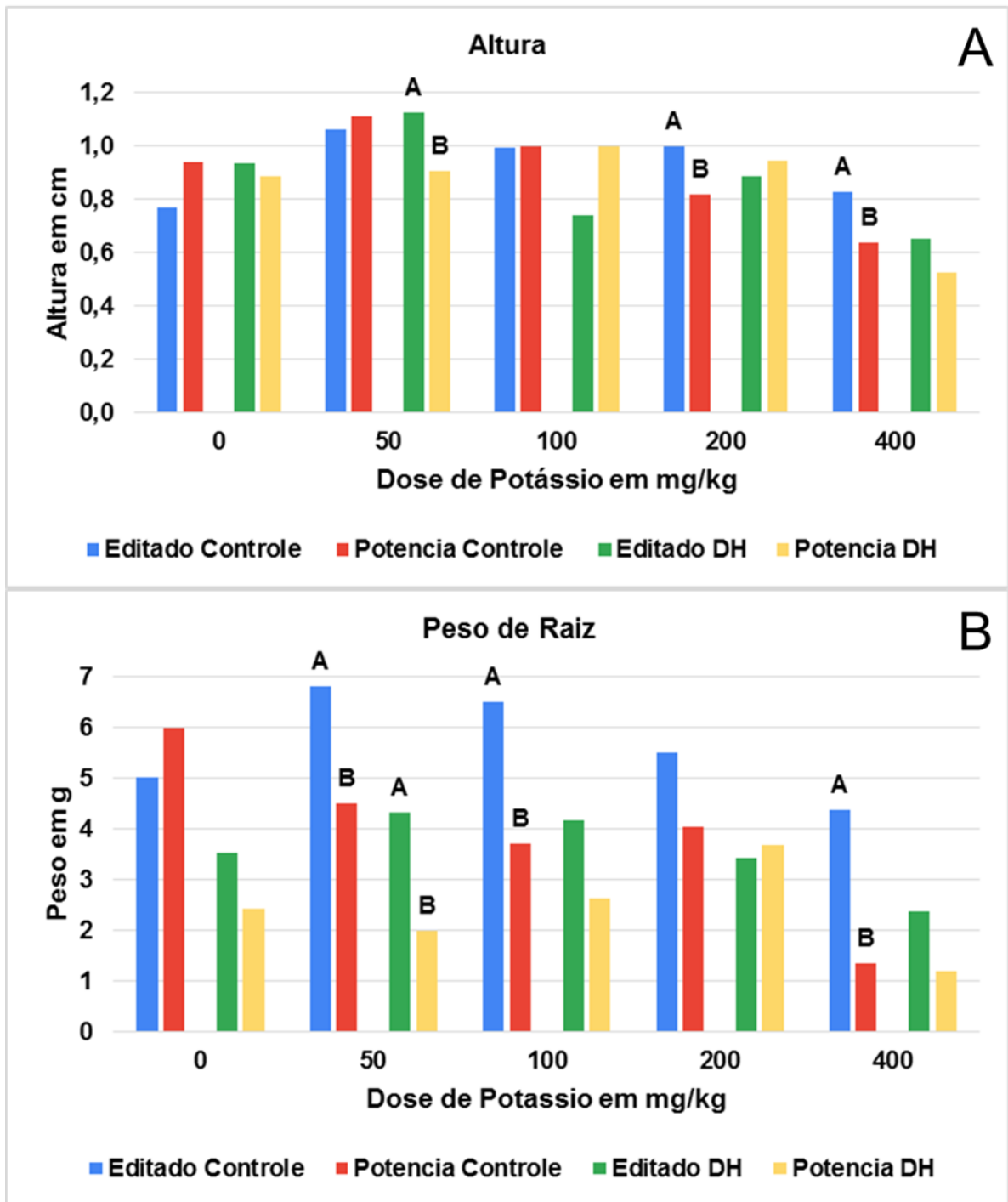


Gráfico 8: Altura das plantas e peso de raiz no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle. Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)

4.6 Determinação De Componentes De Produção e Qualidade Do Grão

Os resultados dos componentes de produção revelaram que a cultivar editada, quando cultivada sob condições de controle, alcançou o maior rendimento em todos os aspectos avaliados na dose de 400 mg/kg de K (Gráfico 9).

Além disso, observou-se um efeito do gene na resposta à alta salinidade, sugerindo que a cultivar editada pode apresentar uma melhor adaptação ou tolerância a condições de estresse salino em comparação com a cultivar não editada.

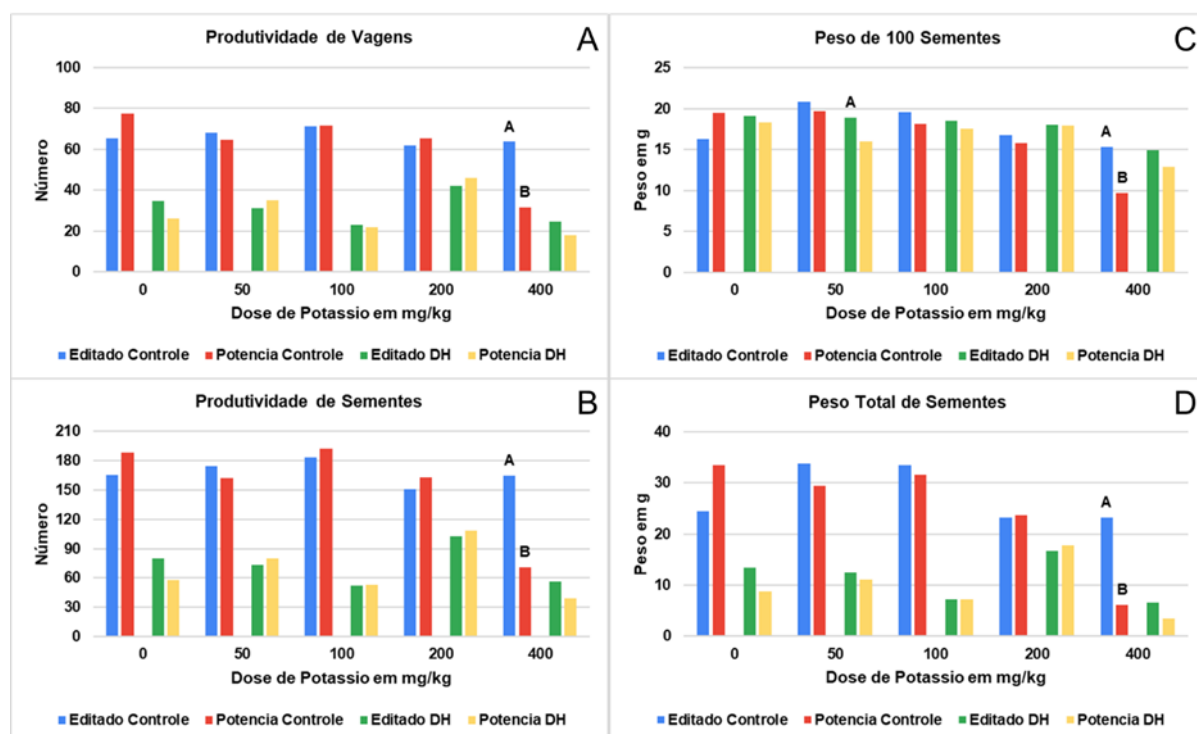


Gráfico 9: Componentes de produtividade das plantas no estágio reprodutivo em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR sem e editada)

Na análise dos teores de óleo, a cultivar BMX Potência RR sob condição de controle apresentou significância, indicando uma influência positiva dessa cultivar nesse aspecto. No teor de óleo a cultivar BMX potência sob condição de controle mostrou significância, e no teor de proteína não teve efeito do gene e doses de potássio (Gráfico 10A). No entanto, para o teor de proteína não foram observados efeitos significativos do gene ou das diferentes doses de potássio (Gráfico 10B).

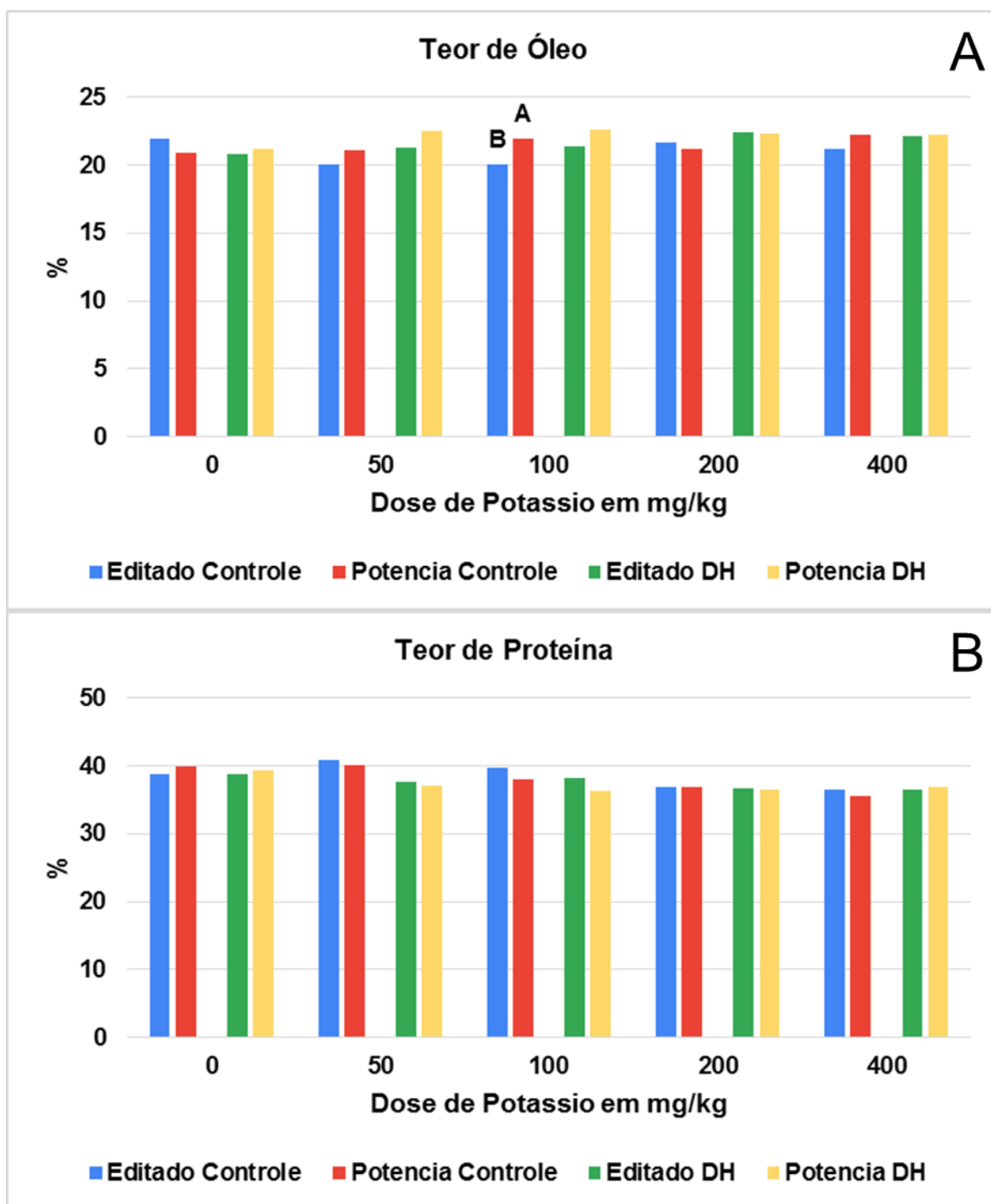


Gráfico 10 Componentes nutricionais (óleo e proteína) das plantas no estágio reprodutivo (B) em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). As letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR e Linha Editada)

Nos teores específicos de ácidos graxos, observa-se que o teor de ácido palmítico apresenta significância no tratamento sem aplicação de potássio para

a cultivar BMX Potência RR sob déficit hídrico (Gráfico 11A). Para o ácido esteárico, a significância é notada na dose de 400 mg/kg de K (Gráfico 11B). No entanto, no teor de ácido oleico, não foram observados efeitos significativos do gene ou das diferentes doses de potássio (Gráfico 11C). Quanto aos teores de linoleico e linolênico, destaca-se o efeito significativo do potássio, especialmente nas doses de 100 e 400 mg/kg de K, para a cultivar editada sob controle (Gráfico 11D e E).

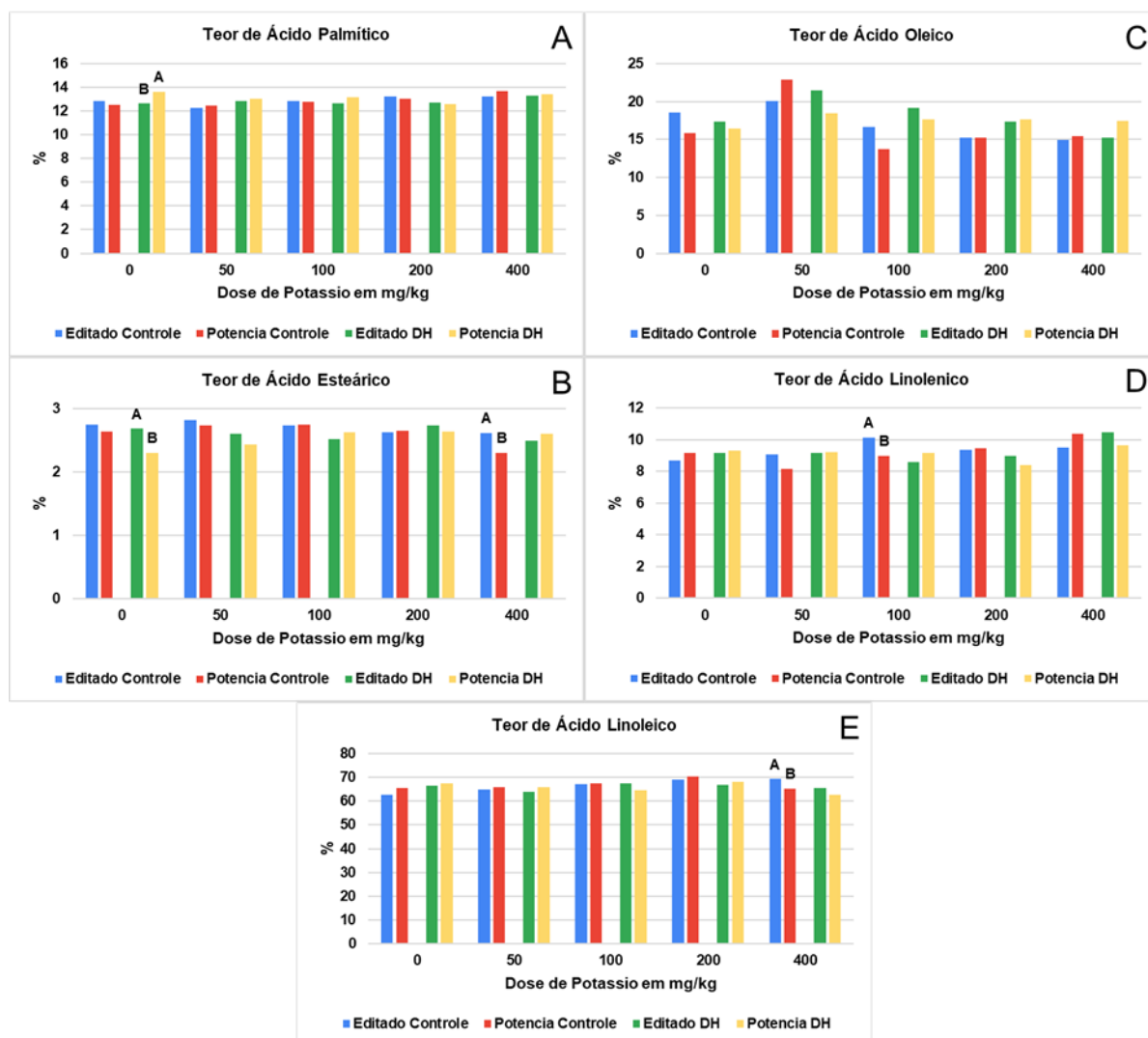


Gráfico 11: Teores de ácidos graxos nos grãos de soja das plantas no estágio reprodutivo, em experimento realizado em casa de vegetação amostrados em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição sob déficit (DH) e controle (C). Letras representam comparação entre cultivares (BMX Potência RR não e editada)

4.7 Análise Da Expressão Gênica No Estágio Reprodutivo

Em folhas de soja foi observado que a expressão do gene DREB2A tem uma alta expressão na planta editada e o gene Gm03g159500 e Gm10g032500, apresentou maior expressão na cultivar BMX Potência RR (Gráfico 12).

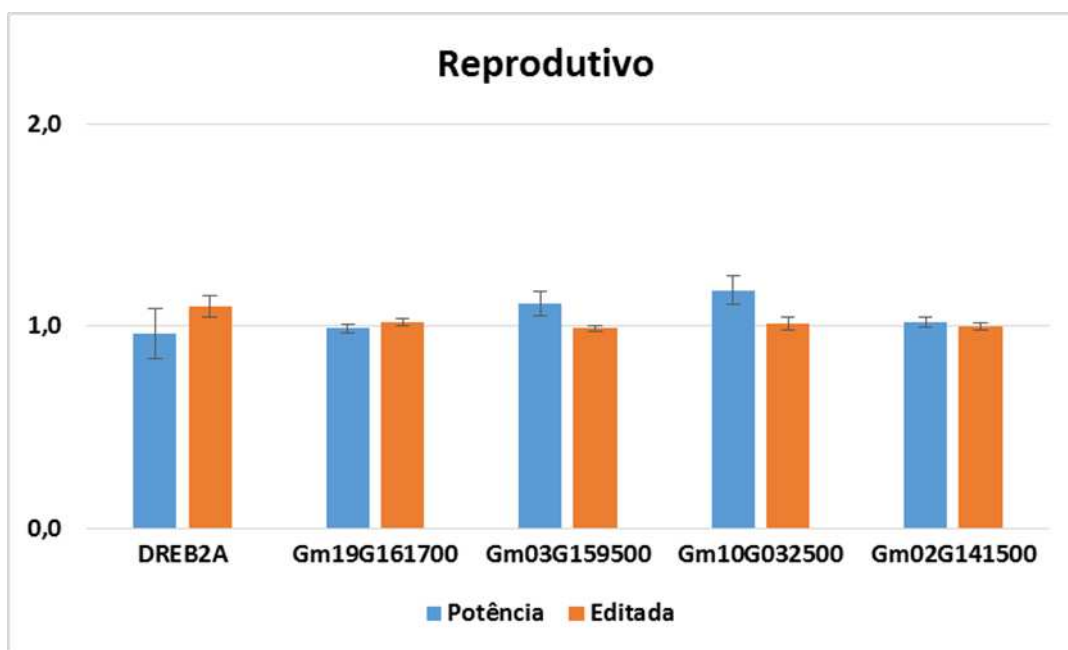


Gráfico 12: Expressão gênica em folhas de soja das plantas no estágio vegetativo, em experimento realizado em casa de vegetação amostradas em plantas de soja da cultivar BMX Potência RR com edição de genes DRIP e sem edição.

5 Discussão

A altura das plantas desempenha um papel crucial no rendimento das plantas, sendo influenciada por fatores como o estresse hídrico. O presente estudo destaca a aplicação de K como um mitigador eficaz do efeito do déficit hídrico, resultando em um aumento significativo na altura da cultivar editada (OMNIA et al., 2022). Este achado está alinhado com pesquisas anteriores de STEINER et al., (2022) que demonstraram o impacto positivo da aplicação de nutrientes no crescimento vegetativo e reprodutivo, mesmo em condições de estresse hídrico prolongado.

Um estudo sobre aplicação de potássio via solução de solo ou folhear, pode influenciar os resultados (DAR et al., 2021) pode ser observado nos gráficos onde o K beneficiou a produtividade no estágio vegetativo (Gráfico 3). Enquanto estudos similares com girassol (*Helianthus annuus* L.) indicaram que a aplicação de K não influenciou a altura das plantas em situações de estresse hídrico prolongado,

ressalta-se que a resposta das plantas a esse nutriente pode variar dependendo da cultura e das condições específicas. Nos resultados apresentados o potássio mostrou ter efeito no estágio reprodutivo (Gráfico 9) isso é uma observação diferente do estudo de *Helinathus annus* L. em girassol.

Para o amendoim (*Arachis Hypogaea* L.), a aplicação de K apresentou resposta significativa na altura da planta em condição de déficit hídrico, conforme evidenciado por Abdelraouf et al. (2023). Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores, incluindo os de Afify et al. (2019) e Almeida et al. (2015). Esses efeitos do potássio foram observados no experimento durante o estágio vegetativo e reprodutivo indicados pelos gráficos apresentados (Gráfico 2;8).

Em batata (*Solanum tuberosum* L.) teve um aumento na matéria seca da parte aérea (MSPA) na matéria seca total (MST) e massa seca de raiz (MSR) (BAHAR et al 2021). Em plantas de colza (*Brassica napus*) a aplicação de K teve o efeito de alongar o comprimento da raiz para a obtenção de água assim aliviando o estresse hídrico (XU et al.; 2021), teve uma relação da MSR no estágio vegetativo para a cultivar editada controle (Gráfico 2)

Na soja, observou-se um efeito semelhante não apenas na altura, mas também na matéria seca da parte aérea (MSPA) e na matéria seca total (MST). Isso sugere que os efeitos adversos da seca no crescimento da parte aérea das plantas de soja foram mitigados pelo adequado fornecimento de potássio, como indicado por Steiner et al. (2022). O que foi observado foi que o K no estágio reprodutivo teve um incremento na massa seca da raiz (Gráfico 8).

Além disso, evidências sugerem que as alterações induzidas pelo estresse hídrico durante a fase vegetativa podem ser reversíveis, com a recuperação das plantas quando o estresse é aliviado (JUMRANI et al., 2018). Essa capacidade de recuperação ressalta a dinâmica complexa das respostas das plantas a diferentes condições ambientais e a importância de estratégias, como a aplicação de potássio, para melhorar a resistência e o desempenho das plantas sob estresse. Esse estudo de Jumrani et al., (2018) foi observado no estágio vegetativo quando as plantas recuperaram após o déficit hídrico, pode ser observados pelos gráficos de rendimento

Isso não se manifesta durante a fase reprodutiva, na qual a planta apresenta uma demanda significativa por água e nutrientes. Se houver deficiência em algum desses requisitos, a planta inicia um mecanismo de aborto de flores e vagens assim diminuindo a sua produtividade. Os gráficos de rendimento indicam a ausência

de efeito do gene, e o K não parece ser eficaz em mitigar os efeitos do déficit hídrico (DU et al., 2020). No entanto, é interessante notar que a aplicação de K nas plantas de controle demonstrou um aumento consistente no rendimento, o que está em conformidade com os resultados observados por Liu et al., (2022) onde a aplicação de potássio aumentou a produtividade.

A aplicação de K durante o estágio vegetativo resultou em um aumento nos componentes de produção, com uma correlação positiva entre a dose de K aplicada e os resultados, como destacado no estudo de Fang et al. (2023) onde a aplicação de potássio teve efeito da produtividade da semente. Esse achado está em consonância com pesquisas relacionadas à aplicação de nanofertilizante de K no amendoim, que demonstrou um aumento na produção de sementes, conforme evidenciado por Afify et al. (2019).

Um experimento conduziu por Shah et al. (2017) concluiu que o estresse hídrico afeta os atributos de crescimento do trigo, enquanto a aplicação de potássio impulsionou o crescimento e também as características de rendimento do trigo sob condições de estresse hídrico. E em milho o déficit hídrico afetou o peso de grão e o rendimento de grãos, mas com a aplicação de K teve significância nesses componentes, e também em condições irrigadas o K teve esses mesmo efeito de aumento (UL-ALLAH et al., 2020). Esse estudos correlacionam com os resultados obtidos em componentes de produção onde com a aplicação de potássio obtivemos um aumento de grãos.

A relevância significativa da soja está intrinsecamente ligada à sua composição, destacando-se principalmente pelos elevados teores de proteína (38-42%) e óleo (18-22%). Essa composição robusta confere à soja uma versatilidade de usos, desde a alimentação humana e animal até aplicações na indústria farmacêutica, indústria química e produção de biocombustíveis (PATIL et al., 2018).

Proteína e óleo emergem como os nutrientes mais abundantes na soja, desempenhando papéis cruciais em sua utilidade. No entanto, opiniões divergentes surgem em relação ao efeito da aplicação de potássio na soja, especialmente no que diz respeito aos teores de proteína e óleo. Conforme apontado por Gupta et al., (2022), a aplicação de potássio resultou em um aumento no teor de óleo da soja, mas, paradoxalmente, contribuiu para a redução do teor de proteína, revelando uma relação inversamente proporcional entre esses dois importantes componentes. Essa relação que esses teores possuem pode não ocorrer, isso foi

observado nos gráficos de teores de óleo e proteína no estágio vegetativo (Gráfico 4) e reprodutivo (Gráfico 10)

No estudo de Bellaloui et al (2013) mostrou que aplicação de fertilizante de potássio resultou um aumento em proteína e óleo indicando que a clássica relação entre óleo e proteína nem sempre ocorre, também foi relatado que o fertilizante K não influenciou os teores de esteárico e linoleico mas teve influência nos teores de oleico. Esse resultado obtido por Bellaloui foi observado nos teores de óleo e proteína nos estágios vegetativo e reprodutivo assim contradizendo o estudo de Gupta et al., (2022)

Nos ácidos graxos, o déficit hídrico revelou influência nos teores de palmítico, esteárico, oleico e linoleico, conforme observado no estudo de Wijewardana et al. (2019). Durante o estresse hídrico, foi constatado um aumento nos teores de ácido oleico e esteárico. Essa resposta foi particularmente evidente no período vegetativo das plantas editadas em ambas as condições, especialmente em relação aos teores de ácido oleico.

O déficit hídrico pode afetar a taxa de acúmulo de ácidos graxos, afetando as enzimas dessaturase de ácidos graxos, uma outra razão para a concentração de ácidos graxos pode ser devida à disponibilidade limitada de açúcares nas plantas de soja e à translocação das folhas para as sementes (Iqbal et al., 2018). No estudo realizado por Dar, Javed Shabbir et al., (2021) no girassol a aplicação de potássio teve efeito nos ácidos esteárico, linoleico e enquanto o déficit hídrico influenciou os teores de oleico.

Não há estudos relatando o número de genes DRIPs presentes no genoma da soja. Barbosa (2022) identificou quatro genes DRIPs em soja ortólogos de genes DRIPs de *Arabidopsis*, que foram descritos como reguladores negativos de DREB2A e que promoveram aumento de tolerância a seca em *Arabidopsis* (QIN et al., 2008). O silenciamento de dois desses genes DRIPs de soja analisados nesse estudo, não resultou em aumento de tolerância ao déficit hídrico, mas considerando que quase 75% dos genes da soja estão presentes em múltiplas cópias (SCHMUTZ et al., 2010), pode ser necessário o silenciamento de todas ou múltiplas cópias de uma família genica para observar o efeito esperado, pois o silenciamento de um gene pode desencadear uma compensação de função em outro gene da família.

Outro aspecto a ser considerado, é que múltiplas ligases E3 podem atuar na mesma via de uma resposta ao estresse ou até mesmo em um substrato

comum para ajustar a resposta. Essa atividade ocorre a em uma rede complexa para regular a resposta de acordo com a força do estresse (QIN, et al. 2008, MORIMOTO et al., 2017). Neste estudo, observamos que os genes DRIPs e DREB2A foram mais expressos quando o déficit hídrico foi imposto no estágio vegetativo (Gráfico 6).

Em *Arabidopsis thaliana*, plantas com silenciamento do gene DRIP mostraram aumento da expressão do gene DREB2A e maior tolerância à seca (QIN et al., 2008). Considerando-se esta via de regulação, o nocaute de proteínas DRIP da soja, potencialmente aumentaria os níveis celulares de DREB2A. Plantas transgênicas de soja superexpressando o gene DREB2A apresentaram tolerância à seca (MARINHO, et al., 2022). Embora não tenha sido evidenciada essa resposta nas plantas editadas, o nível de expressão de DREB2A pode ter sido insuficiente para ativar as resposta moléculas, não resultando em tolerância da planta. Estudos complementares serão necessários para elucidar a complexidade dos processos que afetam a regulação envolvendo os genes DRIP e DREB2A em resposta aos estresses abióticos.

6 Conclusão

O estudo atual destacou o efeito positivo do potássio (K) em várias características das plantas, como altura, massa seca da raiz, componentes de produção e teores de óleo, proteína e ácidos graxos, quando em condições de controle. Não que diz respeito à mitigação do déficit hídrico, a adubação com potássio não foi demonstrada eficácia. Embora o K tenha sido benéfico em condições de déficit hídrico moderado, em situações de déficit hídrico severo, onde a deficiência de água dentro da planta compromete os processos metabólicos, tornando o efeito do potássio menos significativo.

Além disso, a manipulação dos genes DRIPs foi realizada em um aumento da expressão do gene DREB2A em condições de déficit hídrico, porém não resolvido em um aumento da tolerância à seca. Sugere-se que o silenciamento dos outros dois genes DRIPs da soja pode ser necessário para induzir níveis mais elevados de expressão do gene DREB2A e, conseqüentemente obtendo uma resposta significativa.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHEEM, A. et al. Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton. *Industrial Crops and Products*, v. 130, p. 118-129, 2019.
- ABDELRAOUF, Elsayed A.; MOURAD, Khamis. Response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) to potassium, silicon, and selenium foliar application under water stress conditions. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, v. 101, n. 1, p. 142-150, 2023.
- ABOBATTA, W. F. Drought adaptive mechanisms of plants—a review. *Advances in Agriculture and Environmental Science*, v. 2, n. 1, p. 62-65, 2019.
- AFIFY, R. R. et al. Response of peanut (*Arachis hypogaea* L.) crop grown on newly reclaimed sandy soil to foliar application of potassium nanofertilizer. *Middle East Journal of Applied Sciences*, v. 9, n. 1, p. 78-85, 2019.
- AHMAD, P. et al. Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 813, 2016.
- AHMAD, Z. et al. Growth, physiology, and biochemical activities of plant responses with foliar potassium application under drought stress—a review. *Journal of Plant Nutrition*, v. 41, n. 13, p. 1734-1743, 2018.
- AHAMMED, Golam Jalal et al. Light regulation of potassium in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 170, p. 316-324, 2022.
- ALAM, I. et al. Comparative proteomic approach to identify proteins involved in flooding combined with salinity stress in soybean. *Plant and Soil*, v. 346, n. 1, p. 45-62, 2011.
- ALMEIDA, H. J. et al. Effect of potassium on nutritional status and productivity of peanuts in succession with sugar cane. *Journal of soil science and plant nutrition*, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.
- ANJUM, Shakeel A. et al. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2017.

ANJUM, S. A. et al. Growth and development responses of crop plants under drought stress: A review. *Zemdirbyste*, v. 104, n. 3, p. 267-276, 2017.

AUGUSTINE, S. M. et al. Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *Plant Cell Reports*, v. 34, n. 2, p. 247-263, 2015.

BAILLO, Elamin Hafiz et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*, v. 10, n. 10, p. 771, 2019.

BARBOSA, Daniel de Amorim et al. Optimization of GmDRIP Gene Editing Strategies in Soybean. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) State University of Londrina, 82 p, 2022.

BIJALWAN, Priyanka; SHARMA, Meenakshi; KAUSHIK, Prashant. Review of the effects of drought stress on plants: A systematic approach. 2022.

BLATT, M.R. Plant physiology: redefining the enigma of metabolism in stomatal movement. *Current Biology*, v. 26, n. 3, p. R107-R109, 2016.

BUEZO, J. et al. Drought tolerance response of high-yielding soybean varieties to mild drought: physiological and photochemical adjustments. *Physiologia plantarum*, v. 166, n. 1, p. 88-104, 2019.

BHOWMIK, P. et al. CRISPR/Cas9 gene editing in legume crops: Opportunities and challenges. *Legume Science*, v. 3, n. 3, p. e96, 2021.

CHEN, K. et al. Ascorbic acid alleviates damage from heat stress in the photosystem II of tall fescue in both the photochemical and thermal phases. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1373, 2017.

CHEN, Z. et al. Molecular evolution of grass stomata. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 2, p. 124-139, 2017.

CLAUW, P. et al. Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 167, n. 3, p. 800-816, 2015.

CODJOE, Jennette M.; MILLER, Kari; HASWELL, Elizabeth S. Plant cell mechanobiology: greater than the sum of its parts. *The Plant Cell*, v. 34, n. 1, p. 129-145, 2022.

COHEN, Itay et al. Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. *Physiologia Plantarum*, v. 171, n. 1, p. 66-76, 2021.

COSTA, Millena Duarte et al. Expressão de genes responsivos ao déficit hídrico em plantas do semiárido brasileiro: uma revisão sistemática. *CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES*, v. 17, n. 1, p. 7259-7278, 2024.

COTELLE, V.; LEONHARDT, N. 14-3-3 proteins in guard cell signaling. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1210, 2016.

DAR, Javed Shabbir et al. Potassium fertilization improves growth, yield and seed quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress at different growth stages. *Plos one*, v. 16, n. 9, p. e0256075, 2021.

DEMICHELI, J. et al. Improving drought tolerance in soybean by classical breeding leads to physiological adjustments of photosynthesis and stomata functioning. *Plant Stress*, p. 100275, 2023.

DIATTA, A. A. et al. Effects of biochar on soil fertility and crop productivity in arid regions: a review. *Arabian Journal of Geosciences*, v. 13, n. 14, p. 1-17, 2020.

DOYLE, J.J. E J.L. DOYLE. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15. 1990.

DU, Yanli et al. Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean. *Agronomy*, v. 10, n. 2, p. 302, 2020.

DU, Y. et al. Effect of drought stress during soybean R2–R6 growth stages on sucrose metabolism in leaf and seed. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 2, p. 618, 2020.

ENGELS, C. et al. Introduction of the rd29A: AtDREB2A CA gene into soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 556-565, 2013.

FANG, Sheng et al. Potassium fertilizer improves drought stress alleviation potential in sesame by enhancing photosynthesis and hormonal regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 200, p. 107744, 2023.

FANIZZA, G.; RICCIARDI, L. Influence of drought stress on shoot, leaf growth, leaf water potential, stomatal resistance in wine grape genotypes (*Vitis vinifera* L.). *VITIS-Journal of Grapevine Research*, v. 29, p. 371, 2015.

FENG, W. et al. Growing out of stress: the role of cell-and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *The Plant Cell*, v. 28, n. 8, p. 1769-1782, 2016.

FENG, Z. et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, v. 23, n. 10, p. 1229-1232, 2013.

FERREIRA, R. C. Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil. Tese de Doutorado-Universidade Estadual de Londrina, centro de ciências agrárias, programa de pós-Graduação em agronomia, Londrina. 2016.

FLEXAS, J. et al. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology*, v. 6, n. 03, p. 269-279, 2004.

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

GALE, F.; VALDES, C.; ASH, M.. Interdependence of China, United States, and Brazil in Soybean Trade. New York: US Department of Agriculture's Economic Research Service (ERS) Report, p. 1-48, 2019.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. A saga da soja: de 1050a.C a 2050 d.C., Brasília: Embrapa, 199p, 2018.

GOCHE, T. et al. Comparative physiological and root proteome analyses of two sorghum varieties responding to water limitation. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

GUPTA, Rohit et al. Life cycle assessment of biodiesel production from rapeseed oil: Influence of process parameters and scale. *Bioresource Technology*, v. 360, p. 127532, 2022.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, v. 3, n. 1, p. 5-17, 2011.

HASANUZZAMAN, M. et al. Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, v. 8, n. 3, p. 31, 2018.

HILLE, F. et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.

ILYAS, M. et al. Drought tolerance strategies in plants: A mechanistic approach. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 40, n. 3, p. 926-944, 2021.

IQBAL, Nasir et al. Imbalance water deficit improves the seed yield and quality of soybean. *Agronomy*, v. 8, n. 9, p. 168, 2018.

IRSIGLER, A. ST, et al. "Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER-and osmotic-stress pathways." *BMC Genomics* 8.1 (2007): 1-15.

IZADI-DARBANDI, Ali et al. Introducing sorghum DREB2 gene in maize (*Zea mays* L.) to improve drought and salinity tolerance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023.

JANSING, J. et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1, 2-xylose and core α -1, 3-fucose. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, n. 2, p. 350-361, 2019.

JIANG, Zizhu et al. Exogenous ABA enhances the antioxidant defense system of maize by regulating the AsA-GSH cycle under drought stress. *Sustainability*, v. 14, n. 5, p. 3071, 2022.

JOHNSON, R. et al. Potassium in plants: Growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 172, p. 56-69, 2022.

JUMRANI, Kanchan; BHATIA, Virender Singh. Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. *Physiology and Molecular biology of Plants*, v. 24, n. 1, p. 37-50, 2018.

KANAMORI, N.; GIROTTO, L.; NEPOMUCENO, A. L. Agrobacterium mediated Transformation of Brazilian Soybean Variety, BR 16. *JIRCAS Work Rep*, v. 71, p. 75-79, 2011.

LI, Jian-Feng et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 688-691, 2013.

LIU, Changkai et al. Nutritional quality of different potassium efficiency types of vegetable soybean as affected by potassium nutrition. *Food Quality and Safety*, v. 6, p. fyab039, 2022.

LIU, Q. et al. 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. 1391-1406, 1998.

LIU, Z.; PERSSON, S.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, C. At the border: the plasma membrane-cell wall continuum. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 6, p. 1553-1563, 2015.

LIU, Y. et al. Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell*, v. 182, n. 1, p. 162-176. e13, 2020.

LIU, G. et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell*, 2021.

LUO, Y. et al. *Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1221, 2019.

LU, Zhifeng et al. Anatomical variation of mesophyll conductance under potassium deficiency has a vital role in determining leaf photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, v. 39, n. 11, p. 2428-2439, 2016.

MAHMOOD, T. et al. Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance. *Cells*, v. 9, n. 1, p. 105, 2020

MAPA:<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-fecham-2023-com-us-166-55-bilhoes-em-vendas>.

MARCOLINO-GOMES, Juliana et al. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. *PloS one*, v. 10, n. 9, p. e0139051, 2015.

MARINHO, J. P. et al. Overexpression of full-length and partial DREB2A enhances soybean drought tolerance. *Agronomy Science and Biotechnology*, v. 8, p. 1-21, 2022.

MARSCHNER, HoRST. III. Mineral Metabolism: Role of Mineral Elements. *Progress in Botany/Fortschritte der Botanik: Morphology• Physiology• Genetics• Taxonomy• Geobotany/Morphologie• Physiologie• Genetik• Systematik• Geobotanik*, v. 37, p. 98, 2012.

MARTINEAU, E. et al. The role of potassium on maize leaf carbon exportation under drought condition. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, p. 1-13, 2017.

MATSUKURA, S. et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 283, n. 2, p. 185-196, 2010.

MIAO, Jin et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell research*, v. 23, n. 10, p. 1233-1236, 2013.

MIZOI, J. et al. GmDREB2A;2, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. *Plant Physiology*, v.161, p.346-361, 2013.

MORIMOTO, Kyoko et al. BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 40, p. E8528-E8536, 2017.

MOSTOFA, Mohammad Golam et al. Potassium in plant physiological adaptation to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022.

NADEEM, M. et al. Research progress and perspective on drought stress in legumes: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, p. 2541, 2019.

NEKRASOV, Vladimir et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 691-693, 2013.

OMNIA, SM HASHEM; ERAKY, HANIA AM. ALLEVIATION OF WATER STRESS ON SOYBEAN (*Glycine max*) BY FOLIAR APPLICATION OF POTASSIUM. *Journal of Global Agriculture and Ecology*, v. 14, n. 2, p. 10-28, 2022.

OSAKABE, Yuriko et al. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell*, v. 25, n. 2, p. 609-624, 2013.

PAIXÃO, J. F. R. et al. Improved drought stress tolerance in Arabidopsis by CRISPR/dCas9 fusion with a Histone AcetylTransferase. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

PATIL, G. et al. Dissecting genomic hotspots underlying seed protein, oil, and sucrose content in an interspecific mapping population of soybean using high-density linkage mapping. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, n. 11, p. 1939-1953, 2018.

PEREZ-MARTIN, A. et al. Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 12, p. 3143-3156, 2014.

PORNSIRIWONG, W. et al. A chloroplast retrograde signal, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, acts as a secondary messenger in abscisic acid signaling in stomatal closure and germination. *Elife*, v. 6, p. e23361, 2017.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

QIN, F. et al. Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*, v. 20, n. 6, p. 1693-1707, 2008.

QIN, F. et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, v. 50, n. 1, p. 54-69, 2007.

RAWAT, Jyoti; PANDEY, Neha; SAXENA, Jyoti. Role of potassium in plant photosynthesis, transport, growth and yield. *Role of potassium in abiotic stress*, p. 1-14, 2022.

RAZA, S. et al. Potassium applied under drought improves physiological and nutrient uptake performances of wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 13, n. 1, p. 175-185, 2013.

RAZA, A. et al. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: A review. *Plants*, v. 8, n. 2, p. 34, 2019.

RAY, D. K. et al. Climate change has likely already affected global food production. *PloS one*, v. 14, n. 5, p. e0217148, 2019.

REHMAN, S.; MAHMOOD, T. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 37, p. 1-14, 2015.

RIEMANN, M. et al. Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1077, 2015.

ROBBINS, N. E.; DINNENY, J. R. The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro-and macro-scale. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 8, p. 2145-2154, 2015.

SADHUKHAN, Ayan et al. VuDREB2A, a novel DREB2-type transcription factor in the drought-tolerant legume cowpea, mediates DRE-dependent expression of stress-responsive genes and confers enhanced drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, v. 240, p. 645-664, 2014.

SAKUMA, Y. et al. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 49, p. 18822-18827, 2006b.

SAKUMA, Y. et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, v. 18, n. 5, p. 1292-1309, 2006a.

SALINET, Luana Held. Avaliação fisiológica e agrônômica de soja geneticamente modificada para maior tolerância à seca. Universidade de São Paulo, 2009.

SCHEBEN, A.; YUAN, Y.; EDWARDS, D. Advances in genomics for adapting crops to climate change. *Current Plant Biology*, v. 6, p. 2-10, 2016.

SCHMUTZ, J. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, v. 463, n. 7278, p. 178-183, 2010.

SEHGAL, A. et al. Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 1705, 2018.

SELEIMAN, M. F. et al. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, v. 10, n. 2, p. 259, 2021.

SHAN, Q. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 686-688, 2013.

SHARMA, T.; DREYER, Ingo; RIEDELSBERGER, Janin. The role of K⁺ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 224, 2013.

SHI, J. et al. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, n. 2, p. 207-216, 2017.

SIDDIQUI, M. H. et al. Resposta de diferentes genótipos de feijão-fava ao estresse hídrico. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 5, pág. 10214-10227, 2015.

SINGH, K.; CHANDRA, A. DREBs-potential transcription factors involve in combating abiotic stress tolerance in plants. *Biologia*, v. 76, n. 10, p. 3043-3055, 2021.

SLAMINI, Maryam et al. Review on Partial Root-zone Drying irrigation: Impact on crop yield, soil and water pollution. *Agricultural Water Management*, v. 271, p. 107807, 2022.

STANIAK, Mariola; SZPUNAR-KROK, Ewa; KOCIRA, Anna. Responses of soybean to selected abiotic stresses—Photoperiod, temperature and water. *Agriculture*, v. 13, n. 1, p. 146, 2023.

STEINER, Fábio et al. Can potassium fertilization alleviate the adverse effects of drought stress on soybean plants? *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 15, n. 1, p. 99-112, 2022.

SULTAN, B.; DEFRANCE, D.; IIZUMI, T. Evidence of crop production losses in West Africa due to historical global warming in two crop models. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 12834, 2019.

SUSTR, M.; SOUKUP, A.; TYLOVA, E. Potassium in root growth and development. *Plants*, v. 8, n. 10, p. 435, 2019.

TAIZ, L. et al. Plant physiology and development. Sinauer Associates Incorporated, 2015.

TAKAHASHI, F. et al. Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 1407, 2020.

TAKAHASHI, K.; KINOSHITA, T. The regulation of plant cell expansion: auxin-induced turgor-driven cell elongation. *Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells*, p. 156-173, 2016.

TAN, D.X. et al. Cloning and overexpression of GmDREB2 Gene from a vietnamese drought-resistant soybean variety. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.58, n.5, p. 651-657, 2015.

TIBOLA, Casiane Salete et al. Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos. Embrapa: Brasília, Brasil, 2018.

TRÄNKNER, M.; TAVAKOL, E.; JÁKLI, B. Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. *Physiologia plantarum*, v. 163, n. 3, p. 414-431, 2018.

UL-ALLAH, Sami et al. Potassium application improves grain yield and alleviates drought susceptibility in diverse maize hybrids. *Plants*, v. 9, n. 1, p. 75, 2020.

ULLAH, A. et al. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. *Microbiology*, v. 86, n. 1, p. 119-127, 2017.

ULLAH, A et al. A novel cotton WRKY gene, GhWRKY6-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, v. 162, n. 4, p. 439-454, 2018.

ULLAH, A et al. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 33, p. 33103-33118, 2018.

UMAR, S. Alleviating adverse effects of water stress on yield of sorghum, mustard and groundnut by potassium application. *Pak. J. Bot.*, v. 38, n. 5, p. 1373-1380, 2006.

URBAN, J. et al. Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling & Behavior*, v. 12, n. 8, p. e1356534, 2017.

VITAL, R. G. et al. Metabolic, physiological and anatomical responses of soybean plants under water deficit and high temperature condition. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 16467, 2022

XU, Q. et al. Potassium improves drought stress tolerance in plants by affecting root morphology, root exudates, and microbial diversity. *Metabolites*, v. 11, n. 3, p. 131, 2021.

WALTZ, E. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 6, p. 582-583, 2016.

WANG, Q. et al. Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology*, v. 67, n. 6, p. 589-602, 2008.

WANG, M. et al. The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 4, p. 7370-7390, 2013.

WARAICH, E. A. et al. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 12, n. 2, p. 221-244, 2012.

WARAICH, E. A.; AHMAD, R.; ASHRAF, M. Y. Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n. 6, p. 764-777, 2011.

WEI, J. et al. Effects of external potassium (K) supply on drought tolerances of two contrasting winter wheat cultivars. *Plos one*, v. 8, n. 7, p. e69737, 2013.

WIJEWARDANA, C.; REDDY, K. R.; BELLALLOUI, N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. *Food Chemistry*, v. 278, p. 92-100, 2019.

WOLF, Sebastian. Cell wall signaling in plant development and defense. *Annual Review of Plant Biology*, v. 73, p. 323-353, 2022.

YANG, H. et al. Compensatory climate effects link trends in global runoff to rising atmospheric CO₂ concentration. *Environmental Research Letters*, v. 14, n. 12, p. 124075, 2019.

YANG, X. et al. Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, v. 7, n. 3, p. 50, 2021.

YIN, J. et al. Large increase in global storm runoff extremes driven by climate and anthropogenic changes. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 4389, 2018.

ZAHOOR, R. et al. Potassium fertilizer improves drought stress alleviation potential in cotton by enhancing photosynthesis and carbohydrate metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, v. 137, p. 73-83, 2017.

ZHANG, A. et al. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the OsRR22 gene. *Molecular Breeding*, v. 39, n. 3, p. 1-10, 2019.

ZHANG, Ning et al. The E3 ligase TaSAP5 alters drought stress responses by promoting the degradation of DRIP proteins. *Plant physiology*, v. 175, n. 4, p. 1878-1892, 2017.

ZHOU, Yaxing et al. Genome-wide analysis of the soybean DREB gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to drought stress. *Plant Breeding*, v. 139, n. 6, p. 1158-1167, 2020.