



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, METABÓLICA,
FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM OS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO GmDREB2AFL E GmDREB2ACA SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, METABÓLICA,
FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM OS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO GMDREB2AFL E GMDREB2ACA SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, METABÓLICA,
FISIOLÓGICA E AGRONÔMICA DE PLANTAS DE SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADAS COM OS FATORES DE
TRANSCRIÇÃO GmDREB2AFL E GmDREB2ACA SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

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

Orientador: Prof.º Dr.º Alexandre Lima Nepomuceno.

Londrina
2018

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

Marinho, Juliane Praela.

Caracterização molecular, metabólica, fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os fatores de transcrição GmDREB2AFL e GmDREB2ACA sob condição de déficit hídrico / Juliane Praela Marinho. - Londrina, 2018.

110 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.

Coorientador: Juliana Marcolino-Gomes.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Plantas geneticamente modificadas para aumento de tolerância ao déficit hídrico - Tese. 2. Fator de transcrição DREB2A (Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2) - Tese. 3. Caracterização molecular, metabólica, fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com DREB2A - Tese. I. Nepomuceno, Alexandre Lima . II. Marcolino-Gomes, Juliana . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

JULIANE PRELA MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, METABÓLICA, FISIOLÓGICA E
AGRONÔMICA DE PLANTAS DE SOJA GENETICAMENTE
MODIFICADAS COM OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO GmDREB2AFL
E GmDREB2ACA SOB CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr.º Alexandre Lima Nepomuceno
Embrapa Soja – Londrina/PR

Dra.ª Liliane Marcia Mertz-Henning
Embrapa Soja – Londrina/PR

Dr.º Carlos Lásaro Pereira de Melo
Embrapa Soja – Londrina/PR

Dra.ª Larissa Alexandra Cardoso
Embrapa Soja – Londrina/PR

Dr.º Salvador Lima Brito Junior
GDM Genética – Londrina/PR

Londrina, 21 de maio de 2018

*Ao meu esposo, Douglas,
por toda compreensão, incentivo e amor incondicional.*

*Aos meus pais, José Mário e Vanderli,
pela base familiar, educação, carinho e amor.*

*Aos meus irmãos, Junior e Neto,
pelo companheirismo, carinho e apoio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas em minha vida, por iluminar e sempre dar forças para seguir em frente.

À toda minha família, em especial aos meus pais e irmãos, pelo amor incondicional; e ao meu esposo Douglas por todo o companheirismo, amor e paciência ao longo de minha jornada estudantil.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, pela orientação e oportunidade de crescimento pessoal e profissional desde a graduação até o doutorado, por sua paciência e compreensão pelos momentos difíceis enfrentados ao longo dessa jornada.

À Dra. Juliana Marcolino-Gomes, pela co-orientação, correções e sugestões, recebidos para melhor direcionar este projeto; por ser um exemplo de profissional dedicado e persistente à pesquisa. Tenho muito respeito e admiração pela sua ética, seu conhecimento, além de sua amizade.

À Dra. Liliane Marcia Mertz-Henning, por todas as correções e sugestões que auxiliaram no enriquecimento do trabalho, pela disponibilidade, incentivo, confiança e oportunidade oferecidos a mim; em especial, por sua amizade e paciência, admiro sua dedicação e amor à pesquisa. Agradeço muito a oportunidade de ter trabalhado com você.

Aos doutores Luiz Alberto Colnago e Isabel Duarte Coutinho pela parceria e realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMA).

Aos doutores Larissa Alexandra Cardoso, Carlos Lasaro Pereira de Melo, Salvador Lima Brito Junior, Liliane Marcia Mertz-Henning por aceitarem avaliar esta tese com sugestões construtivas, enriquecendo este trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Dias e à Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, coordenadoras eficientes e comprometidas com o curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, obrigada por estarem sempre à disposição para nos ajudar e orientar perante a qualquer dificuldade.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular por todo o conhecimento adquirido ao longo do doutorado.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja, em especial a Dra. Maria Cristina de Oliveira Neves, pelas análises estatísticas que auxiliaram nas interpretações dos resultados deste trabalho.

A todos os funcionários e estagiários da Embrapa Soja que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto. Agradeço em especial aos técnicos e analistas do laboratório de Biotecnologia Vegetal e Ecofisiologia da Embrapa Soja por toda ajuda e amizade.

A todos os amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, por partilharem os momentos mais importantes de minha vida ao longo destes anos. Sem vocês a rotina de laboratório não seria tão agradável e divertida. Em especial aos amigos Willian, Rafaela, André e Patrícia pelo auxílio na montagem e análises dos experimentos e por toda a amizade.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agro pecuária - Embrapa Soja pelo apoio financeiro, concessão da bolsa e disponibilização da estrutura física para a realização deste trabalho, respectivamente.

E todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização e desenvolvimento deste trabalho, o meu sincero agradecimento e reconhecimento. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Juliane Prela Marinho, filha de Vanderli Prela Marinho e José Mario de Melo Marinho, nasceu no dia 03 de setembro de 1989, na cidade de Ourinhos, São Paulo.

Em 2007, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP – *Campus* Luiz Meneghel). Em dezembro de 2010 obteve o grau de licenciatura em Ciências Biológicas.

Realizou estágio de iniciação científica no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) nos anos de 2009 a 2011, sob orientação do Dr. Alexandre Lima Nepomuceno (Embrapa Soja).

Em 2012 ingressou no Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular (UEL), sob orientação do Dr. Alexandre Lima Nepomuceno e co-orientação da Dra. Josirley de Fátima Corrêa Carvalho, e defendeu a dissertação intitulada: “Caracterização de respostas moleculares e fisiológicas de plantas de soja geneticamente modificadas super expressando o fator *AtAREB1* sob déficit hídrico” em 2014. No mesmo ano, ingressou no Programa de Doutorado em Genética e Biologia Molecular (UEL), sob orientação do Dr. Alexandre Lima Nepomuceno e co-orientação da Dra. Juliana Marcolino-Gomes, desenvolvendo a tese intitulada: “Caracterização molecular, metabólica, fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os fatores de transcrição GmDREB2AFL e GmDREB2ACA sob condição de déficit hídrico”, com defesa em 24 de Abril de 2018.

MARINHO, Juliane Prael. **Caracterização molecular, metabólica, fisiológica e agrônômica de plantas de soja geneticamente modificadas com os fatores de transcrição GmDREB2AFL e GmDREB2ACA sob condição de déficit hídrico**. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O cultivo de soja é de extrema importância para economia agroindustrial no mundo inteiro. Atualmente, condições de estresses abióticos, como a seca, têm afetado negativamente a sobrevivência, crescimento e produtividade deste grão. A tolerância à seca é um mecanismo complexo, envolvendo modificações fisiológicas e moleculares que atuam na percepção e resposta da planta à condição ambiental adversa. Alguns genes têm sido descritos como importantes reguladores transcricionais das respostas a esse estresse. O grupo de proteínas *Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2* (DREB2) inclui fatores de transcrição que contribuem para tolerância à seca ativando a transcrição de genes que contém o elemento *cis* DRE em resposta a esses estímulos de estresse. Dois modos de regulação, transcrição e pós-tradução são importantes para a ativação da expressão gênica por DREB2A em *Arabidopsis*. A função básica e a maquinaria reguladora do DREB2 são conservadas entre *Arabidopsis* e soja. Construções contendo GmDREB2AFL (*Glyma14g06080*) e também sua forma ativa GmDREB2ACA foram previamente estudadas em *Arabidopsis*. No presente estudo, objetivou-se caracterizar as respostas moleculares, metabólicas, fisiológicas e agrônômicas de plantas de soja geneticamente modificadas com GmDREB2AFL e GmDREB2ACA sob condições de déficit hídrico. Os resultados mostraram que plântulas do evento GmDREB2AFL obtiveram melhor desempenho sob estresse osmótico na germinação. Além disso, os eventos transgênicos GmDREB2AFL e GmDREB2ACA-1 apresentaram melhor performance em experimentos de tolerância ao déficit hídrico no período vegetativo. Sugere-se que o desempenho superior nesses eventos tenha ocorrido em função de maiores taxas nos parâmetros fisiológicos observados durante o período vegetativo, assim como de maiores níveis de transcritos de genes estresse-induzidos tais como *LEA2*, *LEA6* e *HSP70* presentes nas plantas desses eventos submetidas ao estresse. Quando o déficit hídrico foi imposto no período reprodutivo, observou-se que o evento GM GmDREB2AFL apresentou maior rendimento quando comparado aos demais. Os resultados da análise metabólica também indicaram que as plantas dos eventos GmDREB2AFL e GmDREB2ACA-1 possuíram diferentes ajustes metabólicos em relação a cultivar não transformada o que em parte pode ter contribuído para superioridade destes eventos. Portanto, todos estes resultados demonstram que o fator de transcrição GmDREB2A participa de respostas importantes ao déficit hídrico, em diferentes períodos de desenvolvimento da soja (germinativo, vegetativo e reprodutivo).

Palavras-chave: DREB2A. Tolerância à seca. *Glycine max*. Plantas geneticamente modificadas.

MARINHO, Juliane Prela. **Molecular, metabolic, physiological and agronomic, characterization of genetically modified soybean with the transcription factors GmDREB2AFL and GmDREB2ACA under water deficit condition.** PhD Thesis (Graduate in Genetics and Molecular Biology) - State University of Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Soybean cultivation is extremely important for the agro-industrial economy worldwide. Currently, abiotic stress conditions such as drought and high temperature adversely affected their survival, growth and productivity. Drought tolerance is a complex mechanism involving physiological, metabolic and molecular changes that act on the perception and response to this adverse environmental condition. Some genes have been described as important transcription regulators in response to these stresses. The group of *Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2* (DREB2) includes transcription factors that contribute to drought tolerance and thermal stress by activating the transcription of genes containing the cis element DRE in response to these stress stimuli. Two modes of regulation, transcription and post-translation are important for the activation of *DREB2A* gene expression in *Arabidopsis thaliana*. The basic function and regulatory machinery of the *DREB2* are conserved between *Arabidopsis* and soybean. GmDREB2AFL (*Glyma14g06080*) and its active form GmDREB2ACA were previously studied in *Arabidopsis*. In the present study, the objective was to characterize the molecular, metabolic, physiological and agronomic responses of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA under conditions of water deficit. The results showed that seedlings of the GmDREB2AFL event obtained better performance under osmotic stress on germination. In addition, the GmDREB2AFL and GmDREB2ACA-1 transgenic events presented better performance in water deficit tolerance experiments. It is suggested that the superior performance in these events occurred due to higher rates in the physiological parameters observed during the vegetative period, as well as higher levels of stress-induced genes transcripts such as *LEA2*, *LEA6* and *HSP70* present in the plants of these events under stress. When the water deficit was imposed in the reproductive period, it was observed that the GM GmDREB2AFL event presented higher yield when compared to the others. Metabolic analysis also indicated that the plants of the GmDREB2AFL and GmDREB2ACA-1 events had different metabolic adjustments in relation to the untransformed cultivar, which in part may have contributed to the superiority of these events. Therefore, all these results demonstrate that the GmDREB2A transcription factor participates in important responses to water deficit in different periods of soybean development (germinative, vegetative and reproductive).

Keywords: DREB2A. Drought tolerance. Glycine Max. Genetically modified plants.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2: Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA transcription factors enhances drought tolerance during germinative, vegetative and reproductive developmental periods in soybean

- Figure 1** - Gene expression analyses. Transgene GmDREB2A expression levels in genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 under control (C) and water deficit (WD) condition in vegetative (A) and reproductive (B) developmental periods. Expression values were calibrated with the expression of conventional cultivar BRS 283. Significant differences between BRS 283 and GM plants were assayed using REST 2009 ($*p \leq 0.05$) software, $n=6$ 55
- Figure 2** - Gene expression analyses. LEA6 (A), LEA2 (B) e HSP70 (C) genes expression levels in genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 in control and water deficit in vegetative (A) and reproductive (B) developmental periods. The expression was calibrated with the expressions of the control condition samples. Significant differences between plants of the control condition and plants under water deficit were analyzed by the software REST 2009 ($*p \leq 0.05$) software, $n=6$ 56
- Figure 3** - Growth reduction rate (GRR), in germination phase, of seedlings, hypocotyl and root from soybean genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 and conventional cultivar BRS 283. A = Total length of seedlings; B = Hypocotyl; C = Root growth reduction rate. Means ($n = 20$) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$) 58
- Figure 4** - Test of water deficit tolerance in genetically modified plants (GmDREB2AFL and GmDREB2ACA) and conventional cultivar (BRS 283). Photo was recorded after 19 days of water restriction followed by eight days of re-irrigation, the number of days required until plants presented an evident recovery from water deficit treatment 63

Figure 5 - Daily transpiration of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, under water deficit. Values represent means (n = 20).....	63
Figure 6 - Substrate water potential of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, under water deficit. Means (n = 9) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$)	64
Figure 7 - Water relative content of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, in vegetative period, under control (C) (irrigated) and water deficit (WD). Means (n = 6) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$)	65
Figure 8 - Water relative content of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, in reproductive period, under control (irrigated) and water deficit (WD). Means (n = 6) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by similar uppercase letters (between water conditions) and lowercase letters (among genotypes) do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).....	66

CAPÍTULO 3: OSCILAÇÕES METABÓLICAS EM FOLHAS E RAÍZES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM OS GENES GmDREB2AFL e GmDREB2ACA SOB DÉFICIT HÍDRICO.

Figura 1 - Análise de componentes principais (ACP) de 27 metabólitos dos eventos geneticamente modificados (GMs) da soja GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e da cultivar convencional BRS 283 sob condição controle (C) e déficit hídrico (DH). Score (A) e loading plot (B) das amostras de folhas. Score (C) e loading plot (D) das amostras de raízes	85
Figura 2 - Teor de carboidratos em folhas dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	88

- Figura 3** - Teor de carboidratos em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 90
- Figura 4** - Teor de aminoácidos em folhas dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 92
- Figura 5** - Teor de asparagina em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 94
- Figura 6** - Teor de ácidos orgânicos, colina e 2-hidroxi-isobutirato em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) 95
- Figura 7** - Teor de ácidos orgânicos em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 97

Figura 8 - Teor de 2-hidroxi-isobutirato em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 98

Figura 9 - Representação esquemática das vias metabólicas indicando as principais mudanças após a imposição do déficit hídrico (DH) em folhas e raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283). As caixas ao redor dos metabólitos indicam que foram detectados; os quadrados representam os genótipos, da esquerda para a direita BRS 283, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e GmDREB2AFL; a fileira de quadrados superior se refere às folhas e a inferior às raízes; a cor vermelha dos quadrados representa níveis significativamente maiores (Up-regulado) do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; a cor azul dos quadrados representa níveis significativamente menores (Down-regulado) do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; a cor amarela dos quadrados representa níveis semelhantes do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; os quadrados brancos contendo a sigla ND (não detectado) indicam que o metabólito não foi detectado 99

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2: Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA transcription factors enhances drought tolerance during germinative, vegetative and reproductive developmental periods in soybean.

- Table 1** - Growth parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283 55
- Table 2** - Growth parameters of soybean plants under control and water deficit condition...55
- Table 3** - Physiological parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283 57
- Table 4** - Growth parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit tolerance test 58
- Table 5** - Yield components of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the vegetative period..... 61
- Table 6** - Yield components of soybean plants under control and water deficit in the vegetative period..... 61
- Table 7** - Yield components of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the reproductive period..... 62
- Table 8** - Yield components of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the reproductive period..... 63

CAPÍTULO 3: OSCILAÇÕES METABÓLICAS EM FOLHAS E RAÍZES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM OS GENES *GmDREB2AFL* e *GmDREB2ACA* SOB DÉFICIT HÍDRICO

Tabela 1 - Nível dos metabólitos (mmol) encontrados em folhas e raízes dos genótipos geneticamente modificados (*GmDREB2ACA* e *GmDREB2AFL*) e da cultivar convencional (BRS 283) que apresentaram efeito simples de condição hídrica..... 89

Tabela 2 - Nível dos metabólitos (mmol) encontrados em raízes dos genótipos geneticamente modificados (*GmDREB2ACA* e *GmDREB2AFL*) e da cultivar convencional (BRS 283) que apresentaram efeito simples de genótipo 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	photosynthetic rate;
ABA	ácido abscísico/abscisic acid;
ABF	ABRE-Binding Factor;
ABRE	ABA-responsive elemento;
ACP	Análise de componentes principais;
ANT	AINTEGUMENTA;
AP2	APETALA2;
AREB	ABA-Responsive Element Binding protein;
C	controle/control;
CA	constitutively active;
CaMV 35S	promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor;
CAT	catalases;
CBF	C-repeat Binding Factor;
C _i	CO ₂ intercellular concentration;
CV	coeficiente de variação/coefficient of variance;
DH	déficit hídrico;
DHNs	Dehydrins;
DRE	dehydration responsive element /elemento cis atuante responsivo a desidratação;
DREB	Dehydration Responsive Element Binding;
DREB2	Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2;
GmDREB2AFL	Glyma14g06080 - DREB2A full-length;
DREBs	Dehydration Responsive Element Binding Proteins;
DRN	domínio de regulação negativa;
DW	sample dry weight;
E	transpiration rate;
ERF	Ethylene-Responsive Element Binding Factor;
EROs	espécies reativas de oxigênio;
FA	foliar area;
FC	field capacity;
FT	fator de transcrição;
FTs	fatores de transcrição;

GDM	root dry matter;
GFA	green foliar area;
GM	geneticamente modificado (a)/genetically modified;
GMs	geneticamente modificados (as);
GPCRs	receptores acoplados a proteína G;
GRR	growth reduction rate;
Gs	stomatal conductance;
H1	plant height at the start;
H2	plant height at the end;
HG	hypocotyl growth;
HMDB	Human Metabolome Database;
HSP70	Heat Shock Protein 70;
HSPs	Heat-Shock Proteins;
JIRCAS	Japan International Research Center for Agriculture Science;
LDM	leaves dry matter;
LEA	Late Embryogenesis Abundant;
MEAN G	genotypes mean;
MEAN WC	mean of water condition;
MeJA	methyl jasmonate;
MPa	Soil water potential;
N	nitrogênio;
ND	não detectado;
NS	not significant;
PAR	photosynthetically active radiation;
PC 1	componente principal 1;
PC2	componente principal 2;
PDM	petioles dry matter;
PEG	polietileno glicol;
PGMs	plantas geneticamente modificadas;
PIP1	Plasma Membrane Intrinsic Proteins 1;
PIP2	Plasma Membrane Intrinsic Proteins 2;
POD	peroxidases;
PP2C	fosfatases;
RDM	roots dry matter;

RG	roots growth;
RGR	relative growth rate;
RGRH	relative growth rate in height;
RH	relative humidity;
RLKs	quinases tipo receptor;
RMN	ressonância magnética nuclear;
ROS	reactive oxygen species;
RWC	relative water content;
SA	salicylic acid;
Shsp	small HSP;
SnRK2	quinases;
SOD	superóxido-desmutases;
TCA	ciclo dos ácidos tricarboxílicos;
TDM	total dry matter;
TFs	transcription factors;
TNP	total number of pods;
TPDM	total pods dry matter;
TNS	total number of seeds;
TPS	trealose-6-fostato sintase;
TSDM	total seed dry matter;
TSG	total seedling growth;
TW	sample turgid weight;
W	sample fresh weight;
WD	water deficit;
WXP1	Wax Production1.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1.1	INTRODUÇÃO	21
1.2	OBJETIVOS	23
1.2.1	Objetivo Geral.....	24
1.2.2	Objetivos Específicos	24
1.3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
1.3.1	A cultura da soja e seus desafios de produção	25
1.3.2	Respostas bioquímicas e moleculares ao déficit hídrico.....	27
1.3.3	Mecanismos anatômicos e morfo-fisiológicos de resposta ao déficit hídrico	33
1.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
2	CAPÍTULO 2: Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA transcription factors enhances drought tolerance during germinative, vegetative and reproductive developmental periods in soybean	46
	Abstract	46
2.1	INTRODUCTION	47
2.2	MATERIAL AND METHODS	48
2.2.1	Plasmid and soybean transformation	48
2.2.2	Greenhouse experiment for gene expression analysis and yield components evaluation	49
2.2.3	Gene expression analysis trough RT-qPCR.....	50
2.2.4	Relative growth rate (RGR) in seedlings during germination.....	51
2.2.5	Growth Parameters and physiological responses in the vegetative period	52
2.2.6	Water deficit tolerance test and daily transpiration	53
2.2.7	Statistical analysis.....	53
2.3	RESULTS.....	54
2.3.1	Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA TFs in soybean	54

2.3.2.	Transcripts levels of genes induced in soybean plants submitted to water deficit in the vegetative and reproductive developmental periods.....	55
2.3.3	Seedlings growth rate, in germination period, under osmotic treatment with polyethylene glycol	57
2.3.4	Growth analysis of soybean plants under water deficit imposition in the vegetative developmental period.....	59
2.3.5	Physiological responses of soybean plants transformed with GmDREB2ACA and GmDREB2AFL	59
2.3.6	Water deficit tolerance test with GM plants in vegetative developmental period	62
2.3.7	Analysis of yield components in GM plants, under water deficit, in the vegetative and reproductive periods.....	64
2.4	DISCUSSION.....	67
2.5	REFERENCES	72
2.6	COMPLEMENTARY MATERIAL	73
	Appendix A.....	77
	Appendix B.....	77
	Appendix C.....	78
	Appendix D.....	78
	Appendix E.....	78
3	APÍTULO 3: OSCILAÇÕES METABÓLICAS EM FOLHAS E RAÍZES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM OS GENES GmDREB2AFL e GmDREB2ACA SOB DÉFICIT HÍDRICO	79
	RESUMO.....	79
3.1	INTRODUÇÃO	80
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
3.2.1	Material vegetal e condições experimentais	82
3.2.2	Preparo das soluções e das amostras para análise de ressonância magnética nuclear (RMN).....	82
3.2.3	Instrumentação	83
3.3	RESULTADOS	83

3.3.1	Metabólitos identificados pela análise RMN ¹ H nos eventos GMs e na cultivar BRS 283	83
3.3.2	Análise de componentes principais (ACP)	84
3.3.3	Análise de variância dos metabólitos identificados	86
3.3.3.1	Efeito do déficit hídrico no metabolismo de carboidratos	86
3.3.3.2	Efeito do déficit hídrico no metabolismo de aminoácidos.....	91
3.3.3.3	Efeito do déficit hídrico nos níveis de ácidos orgânicos e demais metabólitos identificados.....	94
3.3.4	Perfis metabólicos dos eventos GMs e da cultivar BRS 283 afetados pelo déficit hídrico	98
3.4	DISCUSSÃO	99
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
3.6	MATERIAL COMPLEMENTAR.....	111
	Apêndice A	111
	Apêndice B.....	112
	Apêndice C	113
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110

1 CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max* (L. Merrill) é a principal oleaginosa produzida e consumida no mundo, sendo importante para o consumo humano, alimentação animal e produção de biocombustíveis. É uma cultura consolidada no Brasil, que está entre os maiores produtores mundiais, com produção obtida na safra 2016/17 de 114,09 milhões de toneladas em uma área de 33,9 milhões de hectares (CONAB, 2017).

O crescimento e a produtividade das culturas são influenciados por diversos fatores bióticos e abióticos. Seca, alagamento, alta temperatura, frio, salinidade e disponibilidade de nutrientes são fatores abióticos que têm um enorme impacto na agricultura e representam mais de 50% na redução do potencial de rendimento para a maioria das grandes culturas (WANG et al., 2003). Dentre os estresses abióticos, a seca é o estresse que mais prejudica o desenvolvimento e a produtividade da cultura da soja (KIDOKORO et al., 2015). Com o aumento da concentração de gases de efeito estufa e consequente aumento do aquecimento global, o índice de ocorrência de períodos de seca tende a ser mais severo em todo o mundo (TRENBERTH et al., 2014).

Todavia, sabe-se que as plantas respondem e adaptam-se a estresses ambientais. Estas adaptações ocorrem em níveis moleculares e celulares, assim como em níveis fisiológicos e bioquímicos. As plantas possuem um sistema complexo de vias regulatórias por meio dos quais ativam inúmeros mecanismos de defesa, como a indução de chaperonas, proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), enzimas antioxidantes, transportadores, e enzimas para biossíntese de metabólitos, por exemplo. Dentro deste sistema de vias regulatórias, vários fatores de transcrição (FTs) e promotores estresse-responsivos funcionam como interruptores moleculares que modulam esta complexa rede de expressão gênica (KIDOKORO et al., 2015). Deste modo, entender a função dos genes que codificam fatores de transcrição e as suas interações permite uma maior compreensão da complexa rede de respostas das plantas aos estresses ambientais, impulsionando o delineamento de novas estratégias moleculares para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico (JOSHI et al., 2016; SANCHEZ et al., 2011).

A família AP2/ERF (*Apetala 2/Ethylene Responsive Factor*) é uma grande família de fatores de transcrição que possuem um domínio conservado de ligação ao DNA. Essa família de fatores de transcrição inclui proteínas de ligação ao elemento *cis* atuante responsivo a

desidratação (DRE), denominados *Dehydration Responsive Element Binding Proteins* (DREBs) (MIZOI et al., 2013). O elemento DRE, que possui a sequência conservada A/GCCGAC, é encontrado nos promotores de diversos genes envolvidos na resposta ao frio, calor, desidratação e alta salinidade. Deste modo, os fatores de transcrição 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 subfamília DREB das proteínas tipo AP2/ERF é classificada em subgrupos de A-1 a A-6, sendo o fator de transcrição DREB2A um membro do subgrupo A-2 (SAKUMA et al., 2002). Várias subfamílias de fatores de transcrição que foram isolados de soja têm sido classificados dentro dos subgrupos A-1 (*GmDREB1*; CHEN et al., 2006), A-2 (*GmDREBa* e *GmDREBc*; LI et al., 2005) e A-5 (*GmDREB1*; CHEN et al., 2007). Mizoi e colaboradores (2013) analisaram um novo gene *DREB2A* encontrado em soja (*Glyma14g06080/GmDREB2A*), que foi altamente induzido por seca, calor e frio. A expressão heteróloga de *GmDREB2A* em *Arabidopsis* induziu genes estresse-regulados por DRE e aumentou a tolerância a seca, comprovando que a maquinaria de DREB2 permanece conservada entre *Arabidopsis* e soja. Todavia, foi observado que, em *Arabidopsis*, o acúmulo do RNA mensageiro de *DREB2A* não é suficiente para a indução de genes *downstream*, sendo necessária uma regulação pós-transcricional para a ativação de DREB2A (LIU et al., 1998; SAKUMA et al., 2006a). Sakuma e colaboradores (2006a,b) relataram que a remoção de um domínio de regulação negativa (DRN) próximo ao domínio de ligação ao DNA converte esta proteína em uma forma constitutivamente ativa (DREB2ACA). Estes autores observaram ainda que, plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *DREB2ACA* apresentaram aumento significativo na tolerância aos estresses por déficit hídrico e alta temperatura.

Fatores de transcrição DREB2 envolvidos em respostas aos estresses abióticos têm sido amplamente estudados em diversas culturas tais como: *Arabidopsis thaliana* (SAKUMA et al., 2006a), *Oryza sativa* (L.) (DUBOUZET et al., 2003), *Zea mays* (L.) (QIN et al., 2007), *Triticum aestivum* (ANDEANI et al., 2009), *Solanum lycopersicum* (L.) (GUO; WANG, 2011), *Vigna radiata* (L.) (CHEN et al., 2016), *Glycine max* (CHEN et al., 2007; LI et al., 2005), dentre outras (LI et al., 2016; MIZOI et al., 2013). Dentro desse contexto, no presente trabalho, o fator de transcrição GmDREB2AFL (*Glyma14g06080* - DREB2A *full-length*) e também sua forma constitutivamente ativa GmDREB2ACA, previamente estudados em *Arabidopsis*, foram introduzidos em embriões da cultivar convencional de soja BRS 283, visando aumento da tolerância ao déficit hídrico na cultura. Os genes estavam sob o controle

do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*CaMV 35S*), comumente utilizado na transformação de plantas (ODELL et al., 1985), devido à sua atividade constitutiva (TESTROET et al., 2017). Os eventos geneticamente modificados originados foram caracterizados quanto a parâmetros moleculares, metabólicos, fisiológicos e agronômicos, em condições controle e sob déficit hídrico, em diferentes períodos de desenvolvimento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar respostas moleculares, metabólicas, fisiológicas e agrônômicas de plantas de soja geneticamente modificadas (GMs) com as construções gênicas *35S:GmDREB2ACA* e *35S:GmDREB2AFL* sob condições de déficit hídrico, em diferentes períodos de desenvolvimento (germinativo, vegetativo e reprodutivo).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar, via RT-qPCR, a expressão das construções *35S-GmDREB2ACA* e *35S-GmDREB2AFL* em plantas de soja transformadas, comparadas a cultivar convencional BRS 283;
- Quantificar, via RT-qPCR, a expressão de genes envolvidos na cascata molecular controlada por GmDREB2A, tais como *LEA2*, *LEA6* e *HSP70*, em plantas de soja transformadas, comparadas com a cultivar convencional BRS 283, submetidas a condições irrigadas (100% capacidade de campo) e sob déficit hídrico;
- Identificar e quantificar os diferentes metabólitos em plantas de soja geneticamente transformadas e cultivar convencional BRS 283 expostas ao déficit hídrico;
- Caracterizar sementes de soja geneticamente modificadas (*35S-GmDREB2ACA* e *35S-GmDREB2AFL*) e cultivar convencional (BRS 283) quanto a tolerância ao estresse osmótico na germinação;
- Caracterizar plantas de soja geneticamente modificadas (*35S-GmDREB2ACA* e *35S-GmDREB2AFL*) e cultivar convencional (BRS 283) nas diferentes condições hídricas, com relação a: trocas gasosas, parâmetros de crescimento, taxa de tolerância ao déficit hídrico, transpiração diária e parâmetros de rendimento.

1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.3.1 A cultura da soja e seus desafios de produção

A soja *Glycine max* (L. Merrill) é uma cultura de origem asiática que foi introduzida no Brasil em 1882, pelo professor Gustavo Dutra da Escola de Agronomia da Bahia. O primeiro registro de cultivo comercial foi em 1914, no município de Santa Rosa, Rio Grande do Sul (RS) (BONATO; BONATO, 1997). Na década de 1960, a produção de soja teve um crescimento expressivo, pois o grão surgiu como uma opção de verão, em sucessão ao trigo, principal cultura do Sul do Brasil à época. O expressivo aumento do preço da soja no mercado mundial, em meados de 1970, despertou ainda mais o interesse dos agricultores e do próprio governo brasileiro para o plantio desta cultura (MEDEIROS, 2004).

A soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo e tem sido o quarto grão mais consumido e produzido globalmente, atrás de milho, trigo e arroz. Aproximadamente 90% dos grãos consumidos são utilizados para gerar farelo e óleo de soja, em uma proporção próxima a 80/20. O farelo de soja junto com o milho constitui a matéria-prima essencial para a fabricação de rações (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). Além disso, o óleo extraído do grão da soja é um dos produtos mais utilizados na alimentação humana, e sua participação no mercado mundial de óleos vegetais comestíveis é de 27,5%. Já a proteína de soja é abundantemente empregada como complemento nutricional em diferentes formas de alimento, com o objetivo de melhorar sua qualidade proteica e com a vantagem de ser mais barata que as proteínas de origem animal (SEDIYAMA, 2009).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja, tendo obtido produção recorde de 114,09 milhões de toneladas na safra 2016/2017. O país ocupa também a posição de maior exportador do produto, sendo que em 2017 foram exportados 64 milhões de toneladas de grãos, provenientes da safra 2016/2017 (CONAB, 2017). A produção nacional é liderada pelos estados de Mato Grosso (27%), Paraná (17,3%), Rio Grande do Sul (16,1%), Goiás (9,6%), Mato Grosso do Sul (7,6%), Minas Gerais (4,4%) e Bahia (4,3%) (CONAB, 2018).

Apesar dos números positivos da cultura da soja, prejuízos econômicos relacionados ao clima, dentre estes a seca, têm apresentado tendência crescente nas últimas décadas (CEDA, 2014). As estiagens mostram seus efeitos negativos à medida que estendem sua duração e conforme coincidem com períodos de implantação das culturas ou com períodos em que o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das plantas são mais sensíveis à baixa disponibilidade hídrica. O Sul do Brasil é uma região que já apresentou recorrentes períodos de estiagem severa. Na safra 2003/2004, deixou-se de colher nos estados do Paraná e Rio

Grande do Sul cerca de 7 milhões de toneladas de soja e, na safra 2004/2005, este cenário foi ainda pior, com perdas de mais de 11,5 milhões de toneladas de soja devido à ocorrência de seca nesses dois estados. (FARIAS et al., 2006).

A safra 2013/14 destacou-se pela ocorrência de um verão atipicamente muito seco, causando grandes perdas de produtividade na agricultura e, apesar da estimativa de produção de 85.656 milhões de toneladas de soja nessa safra (HIRAKURI, 2014), as secas provocaram perdas em todo o país. Os estados Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Goiás foram os estados que mais perderam em produtividade agrícola devido a forte estiagem (Câmara, 2016). Ainda, na safra de 2013/14, o Paraná, segundo maior produtor da oleaginosa, apresentou reduções recordes na produtividade, devido ao longo período em que a lavoura foi afetada pela ausência de chuvas e elevadas temperaturas em janeiro e fevereiro, que correspondem a fases importantes do seu desenvolvimento. Neste estado, o clima reduziu a colheita em 2 milhões de toneladas (12% da estimativa inicial de 16,5 milhões de toneladas). No Rio Grande do Sul, terceiro maior produtor, apesar do forte incremento observado na área plantada, a má distribuição das chuvas ao longo do ciclo produtivo prejudicou o desenvolvimento da cultura na maioria das regiões, provocando redução de 4% nos níveis de produtividade. Na região sudeste, perdas também foram registradas. Em Minas Gerais, maior produtor regional, a estiagem associada a altas temperaturas em fases importantes da lavoura provocaram significativas perdas de produtividade. Em São Paulo, mesmo com incremento expressivo da área plantada, as adversidades climáticas provocaram redução na produtividade em 30,2% (CONAB, 2017; SEAB, 2014)).

Todavia, diversas estratégias podem ser utilizadas para mitigar e reduzir os danos decorrentes de longos períodos de déficit hídrico. Aliada ao melhoramento genético, atualmente, a biotecnologia se tornou mais uma ferramenta essencial na obtenção de plantas mais tolerantes a estresses abióticos. Em níveis moleculares, a resposta à seca envolve a expressão de diversos genes que atuam desencadeando cascatas gênicas, que minimizam o dano causado por desidratação. Neste contexto, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs) com genes que conferem tolerância à seca pode contribuir para minimizar os problemas decorrentes de restrições hídricas. Desde 2004, a Embrapa Soja, em parceria com o *Japan International Research Center for Agriculture Science* (JIRCAS) vem desenvolvendo plantas de soja GMs contendo construções gênicas com fatores de transcrição ou genes chaves de vias metabólicas específicas com o objetivo de obter eventos elites com maior tolerância à seca após testes em casa de vegetação e campo (BARBOSA et al., 2012). Dentre as plantas GMs geradas destacam-se linhagens de soja contendo os genes *AtDREB1/2*

(*Dehydration Responsive Element Binding*), *AtAREB1* (*ABA-Responsive Element Binding protein*), *AtGolS2* (*Galactinol Sintase 2*) e *AtNCED3* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*), que desencadeiam uma série de respostas bioquímicas, moleculares, fisiológicas e agronômicas em resposta ao déficit hídrico. Os resultados obtidos até o momento indicam que em condições de restrição hídrica os genes inseridos promoveram tolerância à desidratação. Contudo, sendo esses genes pertencentes à planta modelo *Arabidopsis thaliana*, novos estudos foram realizados com intuito de identificar e isolar ortólogos de DREB2 em soja. Assim, o JIRCAS desenvolveu e patenteou para testarmos o gene *GmDREB2A* (*Glyma14g06080 - Dehydration Responsive Element Binding Proteins 2*), um novo gene *DREB2A* encontrado em soja que codifica para um fator de transcrição que direciona a expressão de genes que ativam em cascata outros genes envolvidos em defesas celulares contra a dessecação, favorecendo assim maior tolerância à seca, em plantas onde essa construção é introduzida.

1.3.2 Respostas bioquímicas e moleculares ao déficit hídrico

O déficit hídrico é um estresse abiótico que ameaça amplamente o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas. No entanto, as plantas apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e ativam respostas moleculares na percepção de estresses, para lidar com as restrições ambientais. Muitos destes mecanismos contribuem para evitar a desidratação celular através da manutenção do potencial hídrico nos tecidos durante estresses de seca, ativando estratégias de tolerância (GUERRA et al., 2015).

As células vegetais percebem estímulos por meio de vários sensores que, por sua vez, ativam vias de sinalização envolvendo mensageiros secundários, hormônios vegetais, transdutores de sinal e reguladores de transcrição (CVIKROVÁ et al., 2013; DANQUAH et al., 2014; GILROY et al., 2014). Múltiplos sinais convergem para a regulação de genes induzidos por estresse que codificam proteínas e enzimas diretamente envolvidas no metabolismo, contribuindo para a especificidade da resposta de aclimação a um determinado estímulo de estresse (CASARETTO et al., 2016).

O déficit hídrico pode induzir três tipos principais de respostas nas plantas: (a) ativação da maquinaria molecular envolvida na percepção do estresse induzido, sinalização e regulação da expressão gênica para manutenção de processos celulares vitais; (b) alterações na dinâmica de produção e degradação de proteínas com função de mitigar os danos causados pelo estresse, (c) modificações no *pool* metabólico para levar à produção de novas moléculas

relacionadas à resposta ao estresse (BHARGAVA; SAWANT, 2013; SHANKER et al., 2014).

Como parte das respostas das plantas ao déficit hídrico, a regulação da expressão gênica envolve mudanças únicas nos níveis dos transcritos de determinados genes vegetais. A primeira etapa na resposta molecular ao déficit hídrico é a percepção do estresse via receptores específicos. Deste modo, uma via de transdução de sinais inicia-se com a percepção do estresse, seguida pela geração de mensageiros secundários que incluem cálcio, espécies reativas de oxigênio (EROs) e fosfatos de inositol. Tais mensageiros secundários modulam principalmente o nível de cálcio intracelular. As alterações dos níveis citosólicos de cálcio são reconhecidas por proteínas de ligação ao cálcio, também conhecidas como sensores de cálcio. Estas proteínas sensoras ativam uma cascata de fosforilação que culmina na ativação dos principais genes de resposta ao déficit hídrico, ou dos fatores de transcrição que controlam estes genes. Os produtos destes genes levam à adaptação ao déficit hídrico e contribuem para que a planta seja capaz de sobreviver e superar as condições desfavoráveis (HUANG et al., 2015).

Mecanismos moleculares que detectam o estresse consistem em uma série de classes de receptores de superfície celular, como quinases tipo receptores (RLKs), receptores ligados a canais de íons, receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e histidina quinase de dois componentes receptores. Os RLKs são grandes contribuintes para o processamento de uma vasta gama de adaptações ambientais e de desenvolvimento de plantas. A sua atividade é regulada pela solubilização e fosforilação do receptor, internalização e desfosforilação do receptor ou regulação no nível da transcrição (CHAE et al., 2009). Canais de Ca^{2+} são responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} no citoplasma quando ativado por várias situações de estresse (XIONG et al., 2002). Esses canais, portanto, atuam como receptores ligados ao canal iônico do estresse. Os GPCRs são outro grupo de receptores de membrana, que ao detectar enzimas ativadoras do estresse, como a fosfolipase C, por sua vez, liberam os mensageiros secundários e transduzem o sinal de estresse (TUTEJA; SOPORY, 2008).

Alterações na expressão gênica induzidas por estresse também podem participar na síntese de hormônios como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico e etileno. O processo de sinalização do estresse em plantas tem sido dividido em vias dependentes e independentes de ABA. A via de sinalização por ABA é composta pelo hormônio que ligado a proteínas PYR/RCAR, fosfatases (PP2C) e quinases (SnRK2) medeiam a transmissão do sinal (MELCHER et al., 2009; UMEZAWA et al., 2009). De acordo com este mecanismo, o ABA se liga às proteínas PYR/RCAR liberando SnRK2 da repressão induzida pelas PP2Cs. Uma

vez ativada, as quinases fosforilam os fatores de transcrição que ativam genes responsivos ao ABA (na via de sinalização no núcleo celular). Fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA, os *cis*-elementos, presentes na região promotora dos genes alvo, modulando sua expressão. Os fatores de transcrição AREB (*ABA-Responsive Element Binding protein*) ligam-se aos *cis*-elementos *ABA-responsive element* (ABRE) e induzem a expressão de diversos genes alvo em resposta ao déficit hídrico (RAGHAVENDRA et al., 2010).

Sob condições de restrição hídrica, existem também vias de sinalização para ativação da expressão gênica que são induzidas independentemente de ABA. Estas vias envolvem principalmente membros da família *APETALA 2/Ethylene-Responsive Element Binding Factor* (AP2/ERF). A família gênica AP2/ERF é uma das famílias multigênicas mais importantes de fatores de transcrição, sendo classificadas em 3 grupos baseando-se no número de domínios AP2/ERF e função gênica. Os membros da primeira classe codificam uma proteína contendo 2 domínios ERF/AP2 e incluem APETALA2 (AP2), AINTEGUMENTA (ANT), e Glossy15 (ELLIOT et al., 1996; JOFUKU et al., 1994; KLUCHER et al., 1996; MOOSE; SISCO, 1996). Proteínas da segunda classe tem apenas um domínio de ERF/AP2 e incluem EREBPs, TINY, DREB1/CBF, DREB2, Pti5, EBP, ERF, *At*EBP, *At*ERFS, e ABI4 (BUTTNER; SINGH, 1997; FINKELSTEIN et al., 1998; FUJIMOTO et al., 2000; OHME-TAKAGI; SHINSHI; 1995). A terceira classe inclui RAV1 e RAV2, que possuem 2 domínios ERF/AP2 diferentes de ligação ao DNA (JAIN; CHATTOPADHYAY, 2013).

Dentro da família AP2/ERF, a subfamília de fatores de transcrição DREB é presumivelmente a candidata mais promissora para manipulação genética com intuito de alcançar a tolerância à seca, alta salinidade, baixa temperatura e outros estresses abióticos. Os membros da subfamília DREB possuem afinidade com *cis*-elementos de resposta ao déficit hídrico (*Dehydration Responsive Elements* - DRE). O elemento responsivo à desidratação (DRE) foi identificado como um importante *cis*-elemento atuante na regulação da expressão gênica em resposta ao déficit hídrico, alta salinidade e frio (LIU et al., 1998). Durante estresses abióticos, a interação entre os fatores de transcrição DREB e os elementos *cis*-atuantes DRE resulta na ativação de genes estresse-induzidos, importantes na resposta de defesa da planta (MARUYAMA et al., 2012; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Em *Arabidopsis*, proteínas DREB/CBF foram classificadas em 6 pequenos subgrupos (A-1 a A-6), baseado em similaridades no domínio de ligação. Os subgrupos A-1 e A-2

incluem o DREB1/CBF e DREB2, respectivamente. O subgrupo A-3 inclui apenas ABI4, A-4 inclui TINY, A-5 contem RAP2.1, RAP2.9 e RAP2.10, e A-6 inclui RAP2.4 (LIU et al., 1998).

Os genes *DREB1* foram inicialmente identificados na resposta ao frio (LIU et al., 1998), sendo mais tarde também descritos na resposta a alta salinidade (QIN et al., 2004), estresse térmico e déficit hídrico (KIDOKORO et al., 2015). Já os genes *DREB2* foram inicialmente descritos principalmente na resposta ao déficit hídrico (SAKUMA et al., 2002, 2006a), sendo mais tarde associados também ao estresse osmótico (KIM et al., 2011) e térmico (SAKUMA et al., 2006b; SCHRAMM et al., 2008).

A superexpressão dos genes *DREB* em diferentes espécies de plantas como soja (CHEN et al., 2008), milho (QIN et al., 2004), girassol (ALMOGUERA et al., 2009), arroz (BIHANI; CHAR; BHARGAVA, 2011), cana-de-açúcar (REIS et al., 2014) e amendoim (SARKAR et al., 2014), aumentou a tolerância das plantas transgênicas a estresses abióticos. Embora os genes *DREB* sejam considerados parte da via de sinalização independente de ABA, análises de expressão gênica e do acúmulo de proteínas em plantas transgênicas para o gene *ABA responsive AP2-like1 (ARAG1)* de arroz indicam o envolvimento desse gene na sinalização via ABA, sugerindo sua participação na justaposição entre as respostas dependente e independente de ABA (ZHAO et al., 2010).

A transdução do sinal de déficit hídrico e a ativação de fatores de transcrição resultam na expressão de proteínas funcionais *downstream* envolvidas na resposta ao estresse. Em consequência, os genes induzidos por estresses codificam proteínas para proteger a conformação de outras proteínas, RNAs ou estruturas celulares. Os genes de ação única codificam para proteínas funcionais que atuam no metabolismo celular, provavelmente na tolerância ao estresse. Dentre as proteínas codificadas destacam-se as chaperonas, as LEA (*late embryogenesis abundant* – abundante na embriogênese tardia), osmotinas, proteínas anticongelantes e proteínas de ligação ao mRNA, bem como enzimas chaves na biossíntese de osmólitos, proteínas de canais de água, transportadores de açúcar e prolina, além de enzimas de desintoxicação e várias proteases (ALLEN, 2010; BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007).

As chaperonas moleculares são proteínas que, em condições de déficit hídrico contribuem para a homeostase celular uma vez que atuam auxiliando no dobramento de cadeias polipeptídicas recém-formadas, no redobramento de proteínas desnaturadas e na prevenção da agregação de partes proteicas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, prejudicando o dobramento. Muitas chaperonas estão envolvidas em respostas a estresses e

muitas delas foram originalmente identificadas como proteínas de choque térmico (HSPs - *Heat-Shock Proteins*) (COOPER, 2002). As principais famílias de HSPs/chaperonas reconhecidas são HSP70, chaperoninas, HSP90, HSP100 e sHSP (*small HSP*). As diferentes classes de HSPs/chaperonas cooperam na proteção celular e apresentam complementaridade e, algumas vezes, sobreposição de funções na proteção de proteínas contra estresses (WANG et al., 2004). Estudos demonstram que a superexpressão de chaperonas da família HSP70 (AUGUSTINE et al., 2016) e HSP40 (XIA et al., 2014) resultou no aumento da tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar e *Arabidopsis*, respectivamente.

Outro importante grupo de proteínas de proteção contra o déficit hídrico é composto por proteínas da família *Late Embryonic Abundant protein* (LEA). As proteínas LEA são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, quando é requerida a tolerância à dessecação (CLOSE, 1996). Diversos estudos têm demonstrado que as proteínas LEA também se acumulam em tecidos vegetativos durante períodos de déficit hídrico, o que reforça a função destas proteínas na proteção contra a dessecação (PORCEL et al., 2005; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005; YOSHIDA et al. 2010). Tais proteínas são hidrofílicas, apresentando alto conteúdo de glicina (WISE et al., 2004) e, durante a desidratação celular, atuam na manutenção da estrutura de outras proteínas, vesículas e endomembranas, bem como no sequestro de íons como o cálcio, na retenção de água e também atuam como chaperonas moleculares (CLOSE, 1996). Estudos recentes apontam sua participação na estabilização de membranas, na prevenção da agregação de proteínas e no preenchimento do espaço intracelular, formando uma estrutura conhecida como “escudo celular” (CANDAT et al., 2014; CHAKRABORTEE et al., 2012).

Também faz parte da proteção contra a desidratação a indução da expressão de genes relacionados com a biossíntese e transporte de moléculas envolvidas no ajuste osmótico, como aminoácidos e derivados (prolina, ectoína, glicina betaína), polióis (manitol, sorbitol e D-ononitol), açúcares (trealose) e íons K^+ , Na^+ e Cl^- (SILVA et al., 2010). Conforme abordado anteriormente, a síntese e acúmulo dessas moléculas propicia a diminuição do potencial osmótico e hídrico. O ajuste osmótico permite a manutenção de processos que dependem do turgor celular, tais como expansão e crescimento celular, abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter o gradiente de potencial hídrico favorável à absorção de água pelas raízes. Os solutos que participam do ajuste osmótico são inorgânicos, principalmente K^+ e Cl^- , ou compostos orgânicos, os chamados solutos compatíveis como prolina ou glicina-betaína e carboidratos como sacarose, trealose, pinitol, sorbitol ou manitol.

Além do ajuste osmótico, estes solutos também promovem a desintoxicação de EROs, estabilizando as estruturas quaternárias das proteínas (RUIZ-LOZANO, 2003; CHINNUSAMY et al., 2004) durante eventos de desidratação.

O déficit hídrico também modifica a expressão de proteínas de canal de água, denominadas aquaporinas. Em condições normais de hidratação, a água é absorvida nas raízes pelas rotas simplástica e apoplástica (TAIZ; ZEIGER, 2013). No entanto, em condições de déficit hídrico, a rota simplástica assume maior importância, e as aquaporinas assumem um papel importante como canais de controle do fluxo de água entre membranas. Estudos demonstraram que genes que codificam aquaporinas, como *Plasma Membrane Intrinsic Proteins 1 (PIP1)* e *PIP2*, são induzidos pelo déficit hídrico. A superexpressão desses genes resultou no aumento da tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de banana devido à diminuição de danos à membrana e melhor controle do potencial osmótico (XU et al., 2014), e em plantas de tabaco devido à ativação de mecanismos antioxidantes (ZHOU et al., 2012).

Mecanismos de proteção contra a oxidação são extremamente importantes na resposta das plantas às condições limitantes de água, uma vez que o aumento da geração de EROs é uma das consequências do déficit hídrico. Durante o déficit hídrico, EROs são geradas principalmente nos cloroplastos, pela transferência de elétrons para o O_2 , e nos peroxissomos, devido ao aumento da fotorrespiração (CARVALHO, 2008; SUZUKI et al., 2012). Quando em níveis adequados, as EROs possuem um papel importante na manutenção do fluxo de energia nos sistemas de oxido-redução e na sinalização do estresse (BAXTER; MITTLER; SUZUKI, 2014; SUZUKI et al., 2012). Todavia, níveis elevados de EROs causam danos às membranas e outros componentes celulares, podendo resultar na morte celular pois são altamente reativas e tóxicas causando danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (GILL; TUTEJA, 2010). Dentre as principais EROs que causam danos celulares, destacam-se o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o O_2 singleto (1O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (APEL; HIRT, 2004; NEILL et al., 2002).

Para sobreviver às condições de estresse a que frequentemente são impostas pelo ambiente, as plantas desenvolveram sistemas de remoção das EROs composto por enzimas antioxidantes, destacando-se catalases (CAT, EC 1.11.1.6), superóxido-desmutases (SOD, 1.15.1.1) e peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) (WARAICH et al., 2012). A SOD é considerada peça chave neste processo, pois tem como função não só a conversão do radical O_2^- , mas também a capacidade de controlar outras EROs, sendo encontrada principalmente nas mitocôndrias e cloroplastos (MAIA et al., 2012). Em condições de déficit hídrico foram

registradas importantes alterações no metabolismo fotossintético e antioxidante de plantas híbridas de *Prunus* (SOFO et al., 2005), *Vigna unguiculata* (D'ARCY-LAMETA et al., 2006), *Coffea arabica* (DEUNER et al., 2011), *Malus domestica* (LIU et al., 2012). O estudo de diferentes cultivares de cana-de-açúcar sugere que a presença de um sistema eficaz antioxidante para a eliminação de EROs foi responsável por maior nível de tolerância ao estresse por déficit hídrico (BOARETTO et al., 2014).

1.3.3 Mecanismos anatômicos e morfo-fisiológicos de resposta ao déficit hídrico

A seca é o principal fator responsável por afetar o crescimento e a produtividade de importantes culturas. A insuficiência hídrica leva à ocorrência de inúmeras modificações fisiológicas, morfológicas e metabólicas em todos os órgãos vegetais. As plantas são organismos sésseis e, como tal, estão expostas a ambientes dinâmicos que frequentemente impõem dificuldades ao seu crescimento, resultando em significativas perdas no rendimento de espécies com importância econômica, como é o caso da soja (KULCHESKI, 2013).

A tolerância à seca consiste em um traço quantitativo complexo e envolve muitos parâmetros fisiológicos diferentes associados à adaptação das plantas a ambientes desfavoráveis (CATTIVELLI et al., 2008; COSSANI; REYNOLDS, 2012). A insuficiência hídrica induz o fechamento estomático, formação de raízes mais profundas, resistência cuticular e redução de área foliar para a manutenção do turgor das plantas. Por meio de ajuste osmótico atuam também contra a ação de efeitos danosos causados pelo estresse ativando a defesa antioxidante, além de alterações fenológicas como alta taxa de crescimento inicial para uma rápida cobertura do solo, maturação precoce e senescência tardia. Algumas alterações fisiológicas resultam em uma evapotranspiração sazonal total reduzida, mas estas são frequentemente associadas à redução do potencial de produção (CATTIVELLI et al., 2008).

Uma das respostas iniciais contra o déficit hídrico é a diminuição da condutância estomática, que reduz a evaporação através das folhas, diminuindo a perda de água e limitando a difusão de CO₂ para os cloroplastos (SIRICHANDRA et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013). Em resposta ao déficit hídrico, os sistemas de transporte de íons e de água através das membranas funcionam para controlar as mudanças de pressão de turgor nas células guarda e estimulam o fechamento estomático. O fechamento estomático, que durante a seca limita a difusão de CO₂ para o interior do cloroplasto, dá-se em resposta ao aumento das concentrações de ABA que é produzido rapidamente sob tal situação (OSAKABI et al., 2014). Estudos recentes sugerem que a síntese de ABA ocorre em vários órgãos das plantas,

como folhas e raízes, mas também nos tecidos vasculares, e pode mover-se para atingir as células através do xilema e do floema, que permitem o transporte de ABA entre raízes e parte aérea (BOURSIAC et al., 2013; FINKELSTEIN, 2013; MITTLER; BLUMWALD, 2015).

A diminuição da condutância estomática contribui para manter altos níveis de potencial hídrico foliar, mas provoca, em contrapartida, diminuição na atividade fotossintética, limitando a assimilação de CO₂. O transporte de elétrons na fotossíntese e a capacidade de fosforilação nos cloroplastos são reduzidos em plantas expostas ao déficit hídrico. A inibição das reações na cadeia de transporte de elétrons pode formar EROs, as quais podem causar prejuízos fotooxidativos e fotoinibição (KALEFETOGLU; EKMEKÇI, 2005). Além disso, sob condições de déficit hídrico, as plantas também apresentam alguns mecanismos morfológicos de adaptação que previnem a perda de água para o ambiente e mantém a hidratação. O sistema radicular exerce um importante papel em condições de escassez de água. Algumas plantas têm a capacidade de acentuar o crescimento das raízes no início do período de déficit hídrico para que elas absorvam maior quantidade de água do solo (HU; XIONG, 2014). O desenvolvimento de tricomas e pêlos radiculares, redução da área foliar e abscisão foliar induzida em grande parte pela síntese de etileno, permitem a redução da transpiração, além de mudanças no tamanho, orientação das folhas e interceptação da radiação solar por meio do paraheliotropismo. Este movimento altera o ângulo foliar, minimizando a superfície exposta ao sol para a manutenção da temperatura foliar (FU et al., 2013; ISODA; WANG, 2002; TAI; ZEIGER, 2004).

Além da presença de tricomas, a deposição de cera e o aumento na espessura da parede celular são modificações adaptativas para a tolerância ao déficit hídrico, e contribuem para a diminuição da condutância epidermal. Sabe-se que a condutância total de uma planta é resultado da soma das condutâncias estomática e cuticular. Na parte aérea, quando os estômatos estão abertos, a condutância cuticular é uma fração irrelevante de condutância total, mas quando o déficit hídrico leva ao fechamento estomático, o componente cuticular da condutância epidermal pode exceder a condutância estomática. A manipulação do gene *Wax Production1 (WXPI)*, envolvido na produção de cera, resultou em plantas mais tolerantes ao déficit hídrico em *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa* e *Trifolium repens* (JIANG et al., 2010).

As plantas obtêm água e nutrientes por meio das raízes. Conseqüentemente, o sistema radicular exerce um importante papel em condições de escassez de água (HU; XIONG, 2014). O comprimento, peso, volume e densidade das raízes também estão relacionados à tolerância à seca em diversas culturas (PRICE et al., 2002).

As estratégias utilizadas pelas plantas em condições de déficit hídrico podem ser classificadas em quatro grupos distintos: evitamento, tolerância, escape e recuperação à seca. Dentre estes, evitamento e tolerância são os dois principais mecanismos conferidos pelas plantas (FANG; XIONG, 2015). O evitamento à seca é a estratégia de manter níveis altos de água, nos tecidos vegetais, durante períodos de estresse, seja pela maior eficiência na absorção de água pelas raízes ou pela redução da evapotranspiração das partes aéreas. A tolerância à seca permite a planta manter seu turgor e continuar seu metabolismo mesmo em condições de baixo potencial hídrico. Tal estratégia é alcançada através da síntese de osmólitos, osmoprotetores ou solutos compatíveis (NGUYEN; BABU; BLUM, 1997). O termo escape à seca refere-se a uma capacidade natural ou induzida de ajustar o crescimento e desenvolvimento da planta a fim de se evitar a estação ou os períodos de seca prolongada, levando ao crescimento e florescimento precoces, podendo acarretar na diminuição do número de sementes (FANG; XIONG, 2015; WITCOMBE et al., 2008). A recuperação à seca refere-se à capacidade da planta de retomar rapidamente seu crescimento e enchimento de grãos após a exposição a períodos severos de déficit hídrico, quando há a completa paralisação do crescimento, perda do turgor celular e desidratação foliar (LUO, 2010). Embora exista uma divisão didática de estratégias das plantas para tolerar o déficit hídrico, as respostas a esse tipo de condição são complexas e na maioria das vezes envolvem a combinação de mais de uma dessas estratégias, tornando difícil estabelecer fronteiras entre elas.

Em plantas de soja, a disponibilidade de água é especialmente importante em dois períodos de desenvolvimento, entre a germinação de sementes e a emergência de plântulas e entre floração e enchimento de vagens. Nesses períodos, o déficit hídrico pode ser potencialmente prejudicial à homogeneidade do rendimento das lavouras no campo (DOSS; THURLOW, 1974; CÂMARA e HEIFFIG, 2000). Atualmente, a maioria dos estudos avaliam as respostas de adaptação das plantas ao déficit hídrico em períodos específicos de desenvolvimento (ou germinativo, ou vegetativo, ou reprodutivo), o que faz com que muitas vezes os resultados obtidos nesses estudos não resultem em maior rendimento no campo.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, C.D.; MACALADY, A.K.; CHENCHOUNI, H.; BACHELET, D.; MCDOWELL, N.; VENNETIER, M.; KITZBERGER, T.; RIGLING, A.; BRESHEARS, D.D.; HOGG, E.H.; GONZALEZ, P.; FENSHAM, R.; ZHANG, Z.; CASTRO, J.; DEMIDOVA, N.; LIM, J-H.; ALLARD, G.; RUNNING, S.W.; COBB, N. A global overview of drought and heat-

induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. **Forest Ecology and Management**, v.259, p.660-684, 2010.

ALMOGUERA, C.; PRIETO-DAPENA, P.; DÍAZ-MARTÍN, J.; ESPINOSA, J.M.; CARRANCO, R.; JORDANO, J. The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. **BMC Plant Biology**, v.9, p.1-12, 2009.

ANDEANI, J.K.; MOHSENZADEH, S.; MOHABATKAR, H. Isolation and characterization of partial DREB gene from four Iranian *Triticum aestivum* cultivars. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.5, n.5: p.561-566, 2009.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–399, 2004.

AUGUSTINE, S.M. Function of Heat-Shock Proteins in Drought Tolerance Regulation of Plants. **Drought Stress Tolerance in Plants**, v.1, p.163-185, 2016.

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

BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N.; ROS as key players in plant stress signaling. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.1229-1240, 2014.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaption: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, v.132, p.21-32, 2013.

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

BIHANI, P.; CHAR, B.; BHARGAVA. Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation. **The Journal of Agricultural Science**, v.149, p.95-101, 2011.

BOARETTO, L.F.; CARVALHO, G.; BORGIO, L.; CRESTE, S.; LANDELL, M.G.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R.A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 75, p. 165-175, 2014.

BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1997.

BOURSIAC, Y.; LE´RAN, S.; CORRATGE´-FAILLIE, C.; GOJON, A.; KROUK, G. LACOMBE, B. ABA transport and transporters. **Trends in Plant Science**, v.18, n.325–33, 2013.

BÜTTNER, M.; SINGH, K.B. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.5961-5966, 1997.

CÂMARA, G. M. S. **Introdução do agronegócio soja**. Departamento de Produção Vegetal. ESALQ, LPV 584. Piracicaba, fev/2016. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lpv/sites/default/files/LPV%200506%20-%20Soja%20Texto%2001%20-%20%20Agronegocio.pdf>>. Acessado em: 05 out. 2018.

CÂMARA, G.M.S.; HEIFFIG, L.S. Fisiologia, ambiente e rendimento da cultura da soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: G.M.S. CÂMARA, p.81-120, 2000.

CANDAT, A.; PASZKIEWICZ, G.; NEVEU, M.; GAUTIER, R.; LOGAN, D.C.; AVELANGE-MACHEREL, M-H.; MACHEREL, D. The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in *Arabidopsis* offers tailored protection against abiotic stress. **The Plant Cell**, v.26, p.3148-3166, 2014.

CARVALHO, M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p.156-165, 2008.

CASARETTO, J.A.; EL-KEREAMY, A.; ZENG, B.; STIEGELMEYER, S.M.; CHEN, X.; BI, Y-M.; ROTHSTEIN, S.J. Expression of OsMYB55 in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. **BMC Genomics**, v.17, p.1-15, 2016.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F-W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCA, E.; MARÈ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v.105, p.1-14, 2008.

CEDA - THE COMMITTEE FOR ECONOMIC DEVELOPMENT OF AUSTRALIA. **The Economics of Climate Change – June 2014**. Melbourne: CEDA, 2014. 65p. Disponível em: <https://www.ceda.com.au>. Acessado em 05 maio. 2018.

CHAE, L.; SUDAT, S.; DUDOIT, S.; ZHU, T.; LUAN, S. Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the *Arabidopsis* receptor-like kinase gene family. **Molecular Plant**, v.2, p.84-107, 2009.

CHAKRABORTEE S.; TRIPATHI, R.; WATSON, M.; SCHIERLE, G.S.; KURNIAWAN, D.P.; KAMINSKI, C.F.; WISE, M.J.; TUNNACLIFFE, A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. **Molecular Biosystems**, v.8, p.210-219, 2012.

CHEN, H.; LIU, L.; WANG, L.; WANG, S.; CHENG, X. VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, v.129, p.263–273, 2016.

CHEN, M.; WANG, Q.Y.; CHENG, X.G.; XU, Z.S.; LI, L.C.; YE, X.G.; XIA, L.Q.; MA, Y.Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, n.2, p.299-305, 2007.

- CHEN, M.; XU, Z.; XIA, L.; LI, L.; CHENG, X.; DONG, J.; WANG, Q.; MA, Y. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (*Glycine max* L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, p.299–305, 2008.
- CHEN, Y.; CHEN, P.; DE LOS REYES, B. Differential responses of the cultivated and 25 wild species of soybean to dehydration stress. **Crop Science**, v.46, p.2041-2046, 2006.
- CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.225-236, 2004.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.291-296, 1996.
- CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em outubro de 2017.
- CONAB. Levantamento de Safras. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acessos em abril e maio/2018.
- COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2ª Ed., São Paulo, ArtMed Editora, 2002.
- COSSANI, C.M.; REYNOLDS, M.P. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. **Plant Physiology**, v.160, p.1710-1718, 2012.
- CVIKROVÁ, M.; GEMPERLOVÁ, L.; MARTINCOVÁ, O.; VANKOVÁ, R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.73, p.7-15, 2013.
- DANQUAH, A.; ZELICOURT, A.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. **Biotechnology Advances**, v.32, p.40-52, 2014.
- D'ARCY-LAMETA, A.; FERRARI-ILIOU, R.; CONTOUR-ANSEL, D.; PHAM-THI, A.T.; ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany**, v.97, p. 133-140, 2006.
- DEUNER, S.; ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; GOULART, P. F. P.; SILVEIRA, N. M.; HENRIQUE, P. C.; MESQUITA, A. C. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p.77-85, 2011.
- DOSS, B.D.; THURLOW, D.L. Irrigation, row width, and plant population in relation to growth characteristics of two soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v.66, n.620–623, 1974.
- DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v.33, p.751-763, 2003.

- ELLIOTT, R.C.; BETZNER, A.S.; HUTTNER, E.; OAKES, M.P.; TUCKER, W.Q.; GERENTES, D.; PEREZ, P.; SMYTH, D.R. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. **Plant Cell**, v.8, p.155-168, 1996.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, p.673-689, 2015.
- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; TOBITA, S.; ALMEIDA, I. R. Restrições de disponibilidade hídrica: obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, 4., 2006, Londrina. Resumos. Londrina, PR: Embrapa Soja, p.32-33, 2006.
- FINKELSTEIN, R. **Abscisic acid synthesis and response**. Arabidopsis Book 11: e0166, 2013.
- FINKELSTEIN, R.R.; WANG, M.L.; LYNCH, T.J.; RAO, S.; GOODMAN, H.M. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. **The Plant Cell**, v.10, p.1043-1054, 1998.
- FU, Q. S.; YANG, R.C.; WANG, H.S.; ZHAO, B.; ZHOU, C.L.; REN, S.X.; GUO, Y.-D. Leaf morphological and ultrastructural performance of eggplant (*Solanum melongena* L.) in response to water stress. **Photosynthetica**, v.51, p.109-114, 2013.
- FUJIMOTO, S.Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M. Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediate gene expression. **The Plant Cell**, v.12, p.393-404, 2000.
- GERRA, D.; CROSATTI, C., KHOSHORO, H.H., MASTRANGELO, A.M., MICA, E.; MAZZUCOTELLI, E. Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.1-14, 2015.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N.: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.
- GILROY, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G., CHOI, W.G.; TOYOTA, M.; DEVIREDDY, A.R.; DEVIREDDY, A.R.; MITTLER. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in Plant Science**, v.19, p.623-630, 2014.
- GUO, J.; WANG, M-H. Expression profiling of the DREB2 type gene from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under various abiotic stresses. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v.52, p.105-111, 2011.
- HARBORNE, J. B. Progress in botany. **Phytochemistry**, Progress in Botany. v. 15, n.10, p.1571, 1976.
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Documentos 349. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2014.

HIRAKURI, M. H. **Impactos econômicos de estresses bióticos e abióticos na produção da soja**. Londrina: Circular Técnica 105- Embrapa, 2014.

HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 715–41, 2014.

HUANG, D.; WANG, S.; ZHANG, B.; SHANG-GUAN, K.; SHI, Y.; ZHANG, D.; LIU, X.; WU, K.; XU, Z.; FU, X.; ZHOU, Y. A gibberellins-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in rice. **The Plant Cell**, v.27, p.1681-1696, 2015.

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

JAIN, D.; CHATTOPADHYAY, D. Role of DREB-Like Proteins in Improving Stress Tolerance of Transgenic Crops. **Plant Acclimation to Environmental Stress**. p.147–161. 2013.

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

JICA – Japan International Cooperation Agency. Disponível em: <<http://www.jica.go.jp/brazil/portuguese/office/articles/110223.html>> Acesso em: 01 julho de 2011.

JOFUKU, K.D.; BOER, B.G.D; MONTAGU, M.V., OKAMURO, J.K. Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. **The Plant Cell**, v.6, p.1211-1225, 1994.

JOSHI, R.; WANI, S.H.; SINGH, B.; BOHRA, A.; DAR, Z.A.; LONE, A.A.; PAREEK, A.; SINGLA-PAREEK, S.L. Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. **Frontiers in Plant Science**.v.7, n.14, 2016.

KALEFETOĞLU, T.; EKMEKÇI, Y. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. **Journal of Science**, v.18, n.4, p.723-740, 2005.

KIDOKORO, S.; WATANABE, K.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; HTWE, N.M.P.S.; FUJITA, Y.; SEKITA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v.81, p.505-518, 2015.

KIM, J.S.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T. et al. An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. **Plant Cell Physiology**, v.52, p.2136–2146, 2011.

KLUCHER, K.M.; CHOW, H.; REISER, L.; FISCHER, R.L. The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2. **The Plant Cell**, v.8, p.137-153, 1996.

KULCHESKI, F. R. **IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS**
IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE microRNAS. 2013. 51 f.

Dissertação 2013. (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LI, H.; ZHANG, D.; LI, X.; GUAN, K.; YANG, H. Novel DREB A-5 subgroup transcription factors from desert moss (*Syntrichia caninervis*) confers multiple abiotic stress tolerance to yeast. **Journal of Plant Physiology**, v.192, p.45-53, 2016.

LI, X.P.; TIAN, A.G.; LUO, G.Z.; GONG, Z.Z.; ZHANG, J.S.; CHEN, S.Y. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, n.8, p.1355-1362, 2005.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.10, p.1391-1406, 1998.

LIU, B.H.; CHENG, L; MA, F.W. LIANG, D.; ZOU, Y-J. Influence of rootstock on drought response in young 'Gala Gala' apple (*Malus domestica* Borkh.) trees. **Journal Science Food Agricultural**, v.92, n.2421-2427, 2012.

LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of experimental botany**, v.61, p.3509-17, 2010.

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.342-349, 2012.

MARUYAMA, K.; TODAKA, D.; MIZOI, J.; YOSHIDA, T.; KIDOKORO, S.; MATSUKURA, S.; TAKASAKI, H.; SAKURAI, T.; YAMAMOTO, Y.Y.; YOSHIWARA, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of Cis-Acting Promoter Elements in Cold- and Dehydration- Induced Transcriptional Pathways in Arabidopsis, Rice, and Soybean. **DNA Research**, v.19, p.37-49, 2012.

MEDEIROS, L. **Comparativo de custos de produção entre a soja convencional e a soja transgênica na safra 2002/2003-Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Contexto, v.3, p-7-29, 2004.

MELCHER, K.; NG, L. M.; ZHOU, X. E.; SOON, F. F.; XU, Y.; SUINO-POWELL, K. M.; PARK, S. Y.; WEINER, J. J.; FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; KOVACH, A.; LI, J.; WANG, Y.; LI, J.; PETERSON, F. C.; JENSEN, D. R.; YONG, E. L.; VOLKMAN, B. F.; CUTLER, S. R.; ZHU, J. K.; XU, H. E. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. **Nature**, v.462, p.602-608, 2009.

MITTLER, R. AND BLUMWALD, E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. **Plant Cell**, v.27, n.64-70, 2015.

MIZOI, J.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; KIDOKORO, S.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; KUSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *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.

MOOSE, S.P.; SISCO, P.H. Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. **Genes & Development**, v.10, p.3018-3027, 1996.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.388-395, 2002.

NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v.37, p. 1426-1434, 1997.

ODELL, J.T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v.313, p.810-812, 1985.

OHME-TAKAGI, M., SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**, v.7, p.173-182, 1995.

OSAKABI, Y.; OSAKABI, K.; SHINOZAKI, K.; TRA, L-S. Response of plants to water stress. **Frontiers in plant Science**, v.5, p.1-8, 2014.

PORCEL, R.; AZCO'N, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants. **Journal of Experimental Botany**, v.417, p.1933-1942, 2005.

PRICE, A. H.; STEELE, K.A., GORHAM, J.; BRIDGES, J.M.; MOORE, B.J.; EVANS, J.L.; RICHARDSON, P.; JONES, R.G.W. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. **Field Crops Research**, v.76, p.11-24, 2002.

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

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN L.S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K: Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **Plant Journal**, v.50, p.54-69, 2007.

RAGHAVENDRA, A.S.; GONUGUNTA, V.K.; CHRISTMANN, A.; Grill, E. ABA perception and signalling. **Trends in Plant Sciences**, v.15, p.395-401, 2010.

REIS, R.R.; CUNHA, B.A.D.B.; MARTINS, P.K.; MARTINS, M.T.B.; ALEKCEVETCH, J.C.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; ANDRADE, A.C.; RIBEIRO, A.P.; QIN, F.; MIZOI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; CARVALHO, J.F.C.; SOUSA, C.A.F.; NEPOMUCENO, L.; KOBAYASHI, A.K.; MOLINARI, H.B.C. Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, v.221-222, p.59-68, 2014.

- RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, v.13, p.309-317, 2003.
- SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167-173, 2008.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.290, p.998-1009, 2002.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**, v.18, p.1292-1309, 2006a.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p.18822-18827, 2006b.
- SANCHEZ, D. H.; PIECKENSTAIN, F. L.; SZYMANSKI, J.; ERBAN, A.; BROMKE, M.; HANNAH, M. A.; KRAEMER, U.; KOPKA, J.; UDVARDI, M.K. Comparative functional genomics of salt stress in related model and cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics. **PLoS ONE**, v.6, n.2, p.1-11, 2011.
- SARKAR, T.; THANKAPPAN, R.; KUMAR, A.; MISHRA, G.P.; DOBARIA, J.R. Heterologous expression of the AtDREB1A gene in transgenic peanut-conferred tolerance to drought and salinity stress. **PLoS ONE**, v.9, p.1-25, 2014.
- SCHRAMM, F.; Larkindale, J.; kiehlmann, E.; Ganguli, A.; Englich, G.; Vierling, E.; Koskull-Döring. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v.53,p.264–74, 2008.
- SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Soja análise da conjuntura agropecuária. Curitiba, 2014. 18p.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Origem, evolução e importância econômica. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenasa, p.1-5, 2009.
- SHANKER, A.K.; MAHESWARI, M.; YADAV, S.K.; DESAI, S.; BHANU, D.; ATTAL, N.B.; VENKATESWARLU, B. Drought stress responses in crops. **Functional & Integrative Genomics**, v.14, p.11-22, 2014.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, p.221-227, 2007.
- SILVA, E.N.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p.279-285, 2010.

- SIRICHANDRA, C.; WASILEWSKA, A.; VLAD, F.; VALON, C.; LEUNG. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1439–1463, 2009.
- SOFO, A.; TUZIO, A. C.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate–glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science*, v.169, p.403–412, 2005.
- SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v.35, p.259-270, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3^a.ed. Porto Alegre: Artmed, p.719, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5^a. ed. Porto Alegre: Artmed, p.954, 2013.
- TAN, D.X.; TUONG, H.M; THUY, V.T.T.; SON, L.V.; MAU, C.H. 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.
- TESTROET, A.; LEE, K.; LUTH D.; WANG, K. Comparison of transformation frequency using the bar gene regulated by the *CaMV* 35S or NOS promoter in *Agrobacterium*-mediated soybean (*Glycine max* L.) transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.53, n3, p.188-199, 2017.
- TRENBERTH, K. E.; DAI A.; SCHRIER, G V. D.; JONES, P. D.; BARICHIVICH, J.; BRIFFA, K. R.; SHEFFIELD, J. Global warming and changes in drought. **Nature Climate Change**, v.4, p.17-22, 2014.
- TUTEJA, N.; SOPORY, S.K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.8, p.525-536, 2008.
- UMEZAWA, T.; SUGIYAMA, N.; MIZOGUCHI, M.; HAYASHI, S.; MYOUGA, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; ISHIHAMA, Y.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.17588–17593, 2009.
- WANG, K.; L.-C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, v.14, p.131-151, 2002.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A.; Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218, p.1-14, 2003.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Plant Science**, p.1360-1385, 2004.
- WARAICH, E.A.; AHMAD, R.; HALIM, A.; AZIZ, T. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, 221-244, 2012

WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do. **Plant Science**, v.9, p.13-17, 2004.

WITCOMBE, J. R.; HOLLINGTON, P.A.; HOWARTH, C.J.; READER, S.; STEELE, K.A. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v.363, p.703-16, 2008.

XIA, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; SU, X.; LIU, J. Overexpression of a tobacco J-domain protein enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.83, p.100-106, 2014.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, supplement 14, p.S165-S183, 2002.

XU, Y.; HU, W.; LIU, J.; ZHANG, J.; JIA, C.; MIAO, H.; XU, B.; JIN, Z. A banana aquaporin gene, MaPIP1;1, is involved in tolerance to drought and salt stress. **BMC Plant Biology**, v.14, p.1-14, 2014.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-activating regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends Plant Science**. v.10, p.88-94, 2005.

YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; SAYAMA, H.; KIDOKORO, S.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, v.61, p.672-685, 2010.

ZHAO, L.; HU, Y.; CHONG, K.; WANG, T. ARAG1, an ABA-responsive DREB gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. **Annals of Botany**, v.105, p.401-409, 2010.

ZHOU, S.; HU, W.; DENG, X.; MA, Z.; CHEN, L.; HUANG, C.; WANG, C.; WANG, J.; HE, Y.; YANG, G.; HE, G. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **PLoS ONE**, v.7, 2012.

2 CAPÍTULO 2: Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA transcription factors enhances drought tolerance during germinative, vegetative and reproductive developmental periods in soybean

Abstract

Soybean is an important commodity worldwide. Abiotic stress conditions such as drought and high temperature can adversely affect crop growth, development and final yield. Drought and heat tolerance is a complex mechanism involving physiological and molecular changes, which start with stress perception and ended up with responses at different levels to this environmental condition. Some genes have been described as important regulators of these drought-responses. The transcription factors (TFs) Dehydration-Responsive Element-Binding Proteins 2 (DREB2) act in water deficit and heat tolerance by activating the transcription of genes that contains the *cis* element DRE in their promoter region. The functions of full length and constitutively active forms of GmDREB2A (*Glyma14g06080*) (GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, respectively) were previously studied in *Arabidopsis thaliana* (MIZOI et al., 2013). The aim of this study was to characterize soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL (*Glyma14g06080*) and GmDREB2CA for molecular, physiological, phytometric and agronomic responses, in greenhouse under water deficit conditions, at different developmental periods (germinative, vegetative and reproductive). Results showed that seedlings from GmDREB2AFL event presented lower growth reduction under osmotic stress during germination. The GmDREB2AFL and GmDREB2ACA transgenic events presented better performance in experiments of tolerance to water deficit imposed in the vegetative period and higher rates in physiological parameters. In addition, such events stored more water in the substrate. In the reproductive period, it was observed that the GM GmDREB2AFL event presented the highest yield after drought imposition when compared to others. It was proposed that GmDREB2AFL event presented superior performance among the

evaluated genotypes due to the higher expression levels of transgene and drought-induced genes such as *LEA2* (*Glyma09g31740*), *LEA6* (*Glyma17g17860*) and *HSP70* (*Glyma17g08020*), which might have improved water deficit responses. These studies indicated that GmDREB2A participates in important responses to water deficit, in different periods of soybean development (germinative, vegetative and reproductive).

Key words: Water deficit. DREB2A. *Glycine max*, genetically modified.

2.1 INTRODUCTION

Soybean growth, development and final yield can be highly affected by environmental conditions (KIDOKORO et al., 2015). Drought, flooding, high temperature, cold, salinity and nutrition availability are abiotic stresses that can represent up to 50% of yield losses in important crops (WANG et al., 2003). As the second country in the worldwide production (USDA, 2018), Brazilian soybean producers suffer seriously in crop seasons when drought and heat occur, resulting in reduced productivity and financial losses. Seeking alternatives to minimize abiotic stresses damages, scientists are developing plants more tolerant to water deficit and heat, by introducing important responsive genes in soybean cultivars, through genetic engineering techniques. Under the current climate change scenario, these plants could be one strategy to maintain a sustainable agriculture and food supply.

Plants respond to abiotic stresses at molecular, cellular, physiological and biochemical levels, through a complex network of regulatory pathways which activate and regulate a number of genes such as chaperones, LEA proteins, heat shock proteins, antioxidants enzymes, among others, responsible for drought and heat defense mechanisms (MARCO et al., 2015). Besides these, transcription factors (TFs) are also important molecular switches that modulate (activate/deactivate) this complex network response by binding in specific *cis*-elements present in the promoter region of target genes (SINGH et al., 2002).

Dehydration-Responsive Element-Binding Proteins (DREB) TFs family interact with dehydration-responsive element (DRE)/C-repeat (CRT) *cis*-element, thus mediating downstream gene expression in the stress-responsive pathway (AKHTAR et al., 2015). The DRE *cis*-element has a conserved sequence A/GCCGAC in the promoter region of genes involved in cold, heat, drought and high salinity response (MIZOI et al., 2013). By binding and activating transcription of target genes, these TFs improve environmental stress tolerance in plants (TAN et al., 2015).

DREB2A TF has been used to develop genetically modified drought-tolerant plants. The overexpression of a constitutively active (CA) form from DREB2A, a constitutive form which has a negative regulatory domain deletion, in *Arabidopsis*, resulted in significant tolerance to drought and heat stress (SAKUMA et al., 2006a,b). *AtDREB2A* homologous genes were studied in maize (*Zea mays*) (QIN et al., 2007), rice (*Oryza sativa*) (DUBOUZET et al., 2003), sunflower (*Helianthus annuus* L.) (ALMOGUERA et al., 2009), wheat (*Triticum aestivum*) (TERASHIMA; TAKUMI, 2009), potato (*Solanum lycopersicum*) (GUO; WANG, 2011), mung bean (*Vigna radiata*) and chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*) (LIU et al., 2008). Soybean plants transformed with *AtDREB2A CA* gene, showed high expression levels of the transgene in roots subjected to dehydration (ENGELS et al., 2013). Mizoi et al. (2013) identified a soybean *DREB2* gene, *GmDREB2A*, which was highly induced under drought, heat and cold. The heterologous expression of this TF in *Arabidopsis* induced stress-inducible genes such as *RD29A*, *RD29B*, *HsfA3*, and *HSP70* and improved stress tolerance. These findings indicate that plants from different species overexpressing *AtDREB2A* and *DREB2A-like* proteins have increased tolerance to abiotic stress, such as drought and heat, which can occur together under field conditions.

Most of the available literature focuses on understanding drought and heat tolerance in grown plants under greenhouse during vegetative period, not considering responses in seedling or at any specific developmental periods such as vegetative or reproductive phases. Thus, the main objective of this study was to evaluate drought tolerance in soybean plants transformed with *GmDREB2AFL* (*Glyma14g06080*) and *GmDREB2ACA* in seedling, at vegetative and reproductive developmental phases. Molecular, physiological, growth and agronomic parameters were assayed under control and water deficit conditions. These insights can add information on how TF DREB2A acts in soybean plants triggering and controlling a network of complex responses to drought in different developmental periods. This knowledge might facilitate the design of alternative strategies to improve water deficit tolerance in this important commodity crop.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Plasmid and soybean transformation

Two expression cassettes, *pCambia3300J-35S:GmDREB2AFL* and *pCambia3300J-35S:GmDREB2ACA* (*Cambia Enabling Innovation*, 2012) were inserted into soybean

conventional cultivar BRS 283 using *Agrobacterium tumefaciens* methodology. The main difference between the constructions is a deletion at the GmDREB2A negative regulation domain at *pCambia3300J-35S:GmDREB2ACA*, which resulted in the constitutively active form of TF (MIZOI et al., 2013). Both genetic constructions were introduced separately via electroporation into the *A. tumefaciens* strain EHA 105 (HOOD et al. 1993), as described by Casali and Preston (2003). The *GmDREB2AFL* and *GmDREB2ACA* genes were under the control of the constitutive promoter *CaMV 35S* (Cauliflower mosaic virus) and *TNOS* terminator (*A. tumefaciens* nopaline synthase). Two marker genes were also present in the cassette structure: the bar gene (phosphinothricin acetyl transferase), which confers resistance to the herbicide ammonium glufosinate, used as a selective agent; and the NPTII gene (Neomycin phosphotransferase), which confers resistance to the antibiotic kanamycin, used to select the colonies containing the inserted transgene.

Soybean transformation was carried out using the *Agrobacterium tumefaciens* method described by Paz et al. (2006) with modifications, aiming at improving injury for infection; thus, each cotyledon was scratched 10 to 12 times, using a stainless steel micro brush. Seedlings developed during the selection process were transferred to a mixture of substrate/sand (1:1), with the substrate containing soil/sand/organic compounds (3:2:2) and maintained in a growing chamber for acclimation for at least 1 week.

Confirmation of possible positive events was performed through conventional PCR using specific primers to identify the *35SGmDREB2AFL* and *35SGmDREB2ACA* inserts in plant genomic DNA. Positive plants were grown in a greenhouse for selection of events with 3:1 Mendelian segregation in the T₁ generation, and then the generation progress was made to obtain homozygous seeds. Homozygous plants, from the T₃ generation, were used to investigate the molecular, physiological, growth and agronomic responses.

2.2.2 Greenhouse experiment for gene expression analysis and yield components evaluation

Two experiments were performed to evaluate gene expression analysis and determine yield components in soybean under water deficit in two developmental periods (vegetative and reproductive).

To determine the alterations in the vegetative period, an experiment was carried out in greenhouse conditions in completely randomized blocks, in a 4x2 factorial arrangement, i.e. four soybean genotypes (2 events GM with GmDREB2ACA construction, one event GM

with GmDREB2AFL and conventional cultivar BRS 283) and two water conditions (control – C and water deficit – WD), with 6 biological replicates.

Seeds from the T₃ generation were germinated on Germitest[®] paper for 96h at 25 ± 1 °C and 100% relative humidity (RH). Then, seedlings were transferred to 5 kg pots filled with 1:1 sand:substrate mixture (soil-sand-organic compound; 3:2:2), each pot contained only one seedling. All seedlings were cultivated around 80% field capacity (FC), in a greenhouse at 28 ± 2 °C, with temperature and RH recorded every 5 min through a thermohygrograph (Hobo U14-002, Onset[®]).

Water deficit treatment was imposed when plants reached V₃ developmental stage (FEHR; CAVINESS, 1977). At this stage, one day before WD induction, all pots were saturated with water at the end of the afternoon, to allow excess water to be drained overnight. In the following morning, pots were wrapped in polyethylene bags and the central region of each pot was covered with cotton around the stem base in order to prevent water loss by evaporation. Control plants were maintained around 80% FC, while irrigation was withheld in the WD group. After 10 days under water deficit, leaf samples were collected to determine relative water content (RWC), that was expressed taking into account the weight of the fresh, turgid and dry sample, where: FW – sample fresh weight, TW – sample turgid weight and DW – sample dry weight, according to the expression: $RWC = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$. Then, the third fully-expanded trifoliate leaf (apex-base direction) was collected to determine gene expression analysis and immediately frozen in liquid nitrogen.

A second experiment was performed using the same previously described conditions to evaluate soybean responses during reproductive periods. Water deficit treatment was imposed when plants reached R1/R2 developmental stages (FEHR; CAVINESS, 1977). After 10 days of stress treatment, leaf samples of the third fully-expanded trifoliate leaf (apex-base direction) were collected to determine gene expression analysis and immediately frozen in liquid nitrogen.

In both experiments, after the collection for analysis of transcripts, plants were kept under irrigated conditions until the end of the cycle. Fertilization with nutrient solution of Hoagland and Arnon (1950) was performed once a week. Yield components (total number of pods, total pod dry mass, total number of seeds, total dry seed mass and final yield) were determined.

2.2.3 Gene expression analysis through RT-qPCR

Soybean leaves pre-stored from vegetative and reproductive experiments were used for the analysis of gene expression by RT-qPCR. The relative gene expression of transgene *GmDREB2A* (*Glyma14g06080*) and *LEA2* (*Glyma09g31740*), *LEA6* (*Glyma17g17860*), *HSP70* (*Glyma17g08020*) genes were carried out in GM events and in conventional cultivar BRS 283. Gene sequences were uploaded from Phytozome and primers were designed using the Primer3Plus software (Appendix A). Total RNA was extracted from soybean leaf samples using Trizol® reagent, treated with DNase I kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) to remove possible remaining DNA and, eventually, cDNA was synthesized using SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen/ Catalog number: 180800), according to the manufacturer's instructions.

Relative quantification of gene expression was carried out in three biological samples (each one represented by a bulk of two biological replicates) (n=6), and three technical replicates. Reactions were composed of cDNAs, 0.2 µM F and R primers and 1x reaction buffer Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). Reactions were made through a 7900HT thermocycler (Applied Biosystems), using the following cycling parameters: 50 °C for 2 min, denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, 95 °C for 15 s, 60 °C for 15 s, and 95 °C for 15 s. Expression level was determined using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Statistical analysis was performed using REST 2009 software (PFAFFL et al., 2002). Genes *ELF1B* (*Glyma13g04050*) and *FYVE* (*Glyma13g17500*) were used as endogenous reference for normalizing expression data (MARCOLINO-GOMES et al., 2015). To quantify relative gene expression, control plants (without water deficit) were used as calibrators to evaluate the relative expression in the case of *LEA2*, *LEA6* and *HSP70* genes. In order to evaluate the overexpression of the *GmDREB2A* gene inserted in the genetically modified events, the calibration of the expression was carried out in comparison to the plants of the conventional cultivar BRS 283, which have the presence of the corresponding endogenous of this gene.

2.2.4 Relative growth rate (RGR) in seedlings during germination

Germination of soybean seeds from GM events *GmDREB2ACA-1*, *GmDREB2ACA-2* and *GmDREB2AFL*, and conventional cultivar BRS 283 were tested in the following concentrations of polyethylene glycol (PEG-8000): 0.0MPa control and -0.2MPa (118.9 g L⁻¹) (VILLELA; BECKERT, 2001). Level zero corresponded to the control condition, in which distilled water was used.

The experimental design was completely randomized, with four replicates in each tested condition (0.0 and -0.2 MPa). Each replicate contained 20 seeds. The seeds were arranged in sheets of paper for germination, moistened with water volume equivalent to two and a half times the mass of the dry paper, and germinated for 120 h, at 25 ± 1 °C and 100% relative humidity (RH).

Total seedling (TSG), hypocotyl (HG) and roots (RG) growth were measured. Using these data, growth reduction rate (GRR) was assayed by comparing plants grown under control and osmotic treatment (PEG-8000), according to the equations:

$$\text{Eq 1: } \text{GRR}_{\text{TSG}} = 100 \times (\text{TSG}_c - \text{TSG}_{-0,2}) / \text{TSG}_c$$

$$\text{Eq 2: } \text{GRR}_{\text{HG}} = 100 \times (\text{HG}_c - \text{HG}_{-0,2}) / \text{TSG}_c$$

$$\text{Eq 3: } \text{GRR}_{\text{RG}} = 100 \times (\text{RG}_c - \text{RG}_{-0,2}) / \text{TSG}_c$$

2.2.5 Growth parameters and physiological responses in the vegetative period

The same conditions described in item 2.2.2 were applied for seeds germination. Seedlings were transferred to 1L pots filled with 1:1 sand:substrate mixture (soil-sand-organic compound 3:2:2), each pot containing only one seedling. The experiment was performed in completely randomized blocks, in a 4x2 factorial arrangement, i.e. four soybean genotypes (2 GM events with GmDREB2ACA construction, 1 GM event with GmDREB2AFL and the conventional cultivar BRS 283) and 2 water conditions (control – C and water deficit – WD), with 9 replicates.

Water deficit treatment was imposed when plants reached V₃ developmental stage (FEHR; CAVINESS, 1977). After WD induction, plants stomatal conductance (*gs*) was monitored daily until WD plants showed *gs* values lower than 0,2 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ (FLEXAS et al., 2004). At this point, gas exchange parameters – photosynthetic rate (*A*), intercellular CO₂ concentration (*C_i*), transpiration rate (*E*), and stomatal conductance (*gs*) – were measured on the central leaflet of the third fully-expanded trifoliolate leaf (apex-base direction) through a portable infrared gas analyzer (LI-6400XT, LI-COR). Measurements were performed inside the greenhouse at 9.00 a.m. (Brazilian daylight saving time) at 1000 μmol m⁻² s⁻¹ photosynthetically active radiation (PAR), CO₂ reference of 400 μmol mol⁻¹, water reference of 18-20 mmol mol⁻¹ and CO₂ flux of 400 μmol s⁻¹.

Additionally, plant height was measured at the start (H1) and at the end (H2) of WD period. The mean length of internodes corresponded to the ratio between H2 and the number of nodes. The relative growth rate in height (RGRH) was calculated according to the

equation: $RGRH (\%) = [(H2 - H1)/H1] \times 100$. Total leaf area was measured using a leaf area meter (LI 3100C). Then, leaf blades, stems, petioles and roots were dried in a forced aeration oven at 60 °C to constant weight, so that shoot dry matter (leaf blades + stems + petioles) and root dry matter (per plant) and total dry matter were weighed. Soil water potential (MPa) was determined in WD group using a WP4C (Decagon) potential meter.

2.2.6 Water deficit tolerance test and daily transpiration

Seeds from T₃ generation of GM events GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 and GmDREB2AFL and conventional cultivar BRS 283 were germinated as described in 2.2.2. Then, seedlings were transferred to 1L pots filled with 1:1 sand:substrate mixture (soil-sand-organic compound 3:2:2), each pot containing only one seedling. The experiment was carried out in a completely randomized block, with 20 replicates.

Pots were irrigated daily with 100 mL of water, enough to keep substrate saturated. When plants reached V2 developmental stage (FEHR; CAVINESS, 1977), irrigation was withheld. Plants were kept under WD for 19 days, and during this period the differences in daily transpiration (g day⁻¹) of the plants were assessed by the loss of water between successive days through the daily weighing of pots, always starting at 9:00 a.m. After water deficit treatment, all plants were rehydrated until the plants showed an evident recovery to the water deficit, in this case eight days. After this period, the green leaf area (dm²) of the stressed plants was measured, using the equipment LI-3100C. The dry mass of the different tissues (leaf blades, stems plus petioles and roots) was also analyzed as described in item 2.5. Green leaf area and dry matter analyses of plant tissues were carried out to evaluate the tolerance of the genetically modified plants in relation to BRS 283 non-transformed cultivar.

2.2.7 Statistical analysis

Data from germination test, physiological, growth and agronomic responses showed a normal distribution and were submitted to the analysis of variance (ANOVA). The comparison of means was performed by the Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.3 RESULTS

2.3.1 Overexpression of GmDREB2AFL and GmDREB2ACA TFs in soybean

Under control conditions in vegetative and reproductive developmental periods, transgene expression was significantly high for all three GM events when compared to expression identified in conventional cultivar BRS 283, which was used as calibrator sample (Figure 1). The highest levels of transgene expression were detected for GmDREB2AFL event, followed by GmDREB2ACA-1 and GmDREB2ACA-2 GM events (Figure 1).

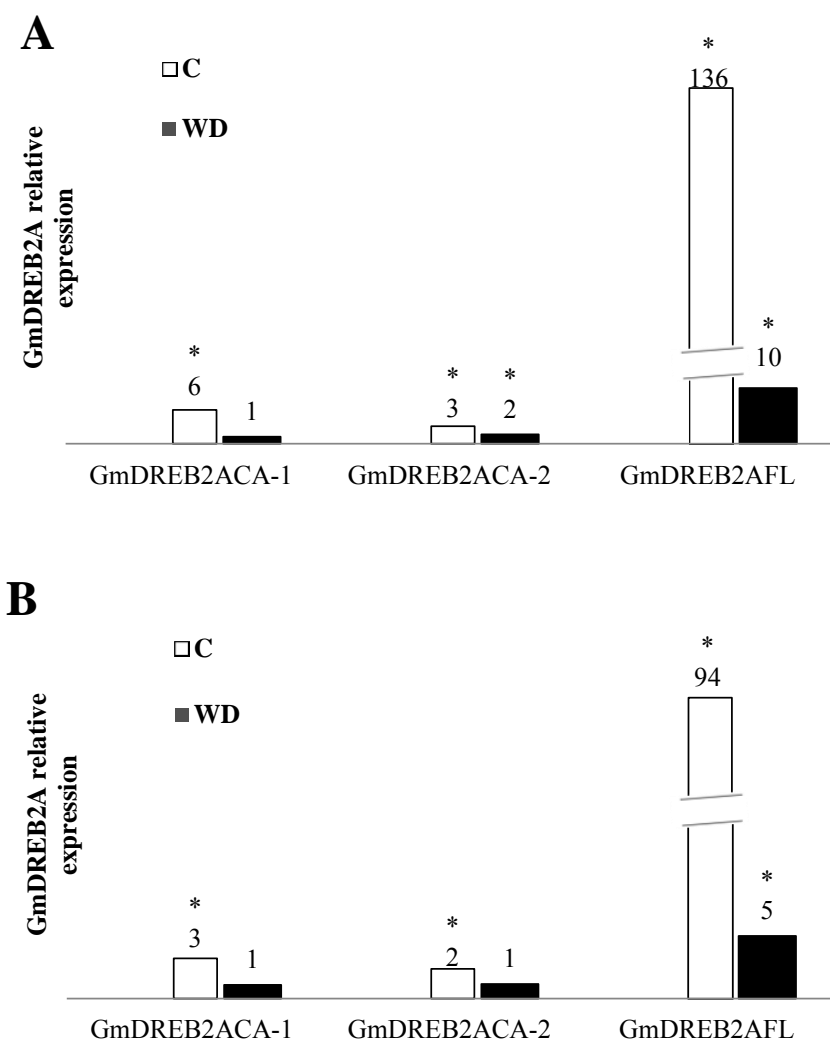


Figure 1 - Gene expression analyses. Transgene *GmDREB2A* expression levels in genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 under control (C) and water deficit (WD) condition in vegetative (A) and reproductive (B) developmental periods. Expression values under C conditions were calibrated with the expression of conventional cultivar BRS 283 under C conditions, and expression values under WD conditions were calibrated with the expression of conventional cultivar BRS 283 under WD conditions. Significantly differences between BRS 283 and GM plants were assayed using REST 2009 ($*p \leq 0.05$) software, n=6.

Under water deficit conditions, the GmDREB2AFL event again presented the highest transcript levels when compared to the conventional cultivar BRS 283, both in the vegetative (Figure 1A) and in the reproductive periods (Figure 1B).

2.3.2. Transcripts levels of stress-induced genes in soybean plants submitted to water deficit in the vegetative and reproductive developmental periods

Under water deficit imposed in the vegetative developmental period, *LEA6* gene (*Glyma17g17860*) expression level was higher for all three GM events when compared to the conventional cultivar BRS 283. Under water deficit conditions in the reproductive period, GmDREB2ACA-1 and GmDREB2AFL showed higher expression levels of *LEA6* when compared to conventional cultivar BRS 283 and GM event GmDREB2ACA-2 (Figure 2A). For *LEA2* gene (*Glyma09g31740*), higher expression levels were identified for GM events GmDRE2ACA-1 and GmDREB2AFL, under water deficit imposed in both vegetative and reproductive developmental periods, when compared to BRS 283 and GM event GmDREB2ACA-2 (Figure 2B). Still, higher levels of *LEA2* gene expression were identified in reproductive period in relation to vegetative period, for all evaluated genotypes (Figure 2B). Opposite response was observed to *LEA6* gene (Figure 2A) that showed higher expression levels during vegetative period for all the genotypes.

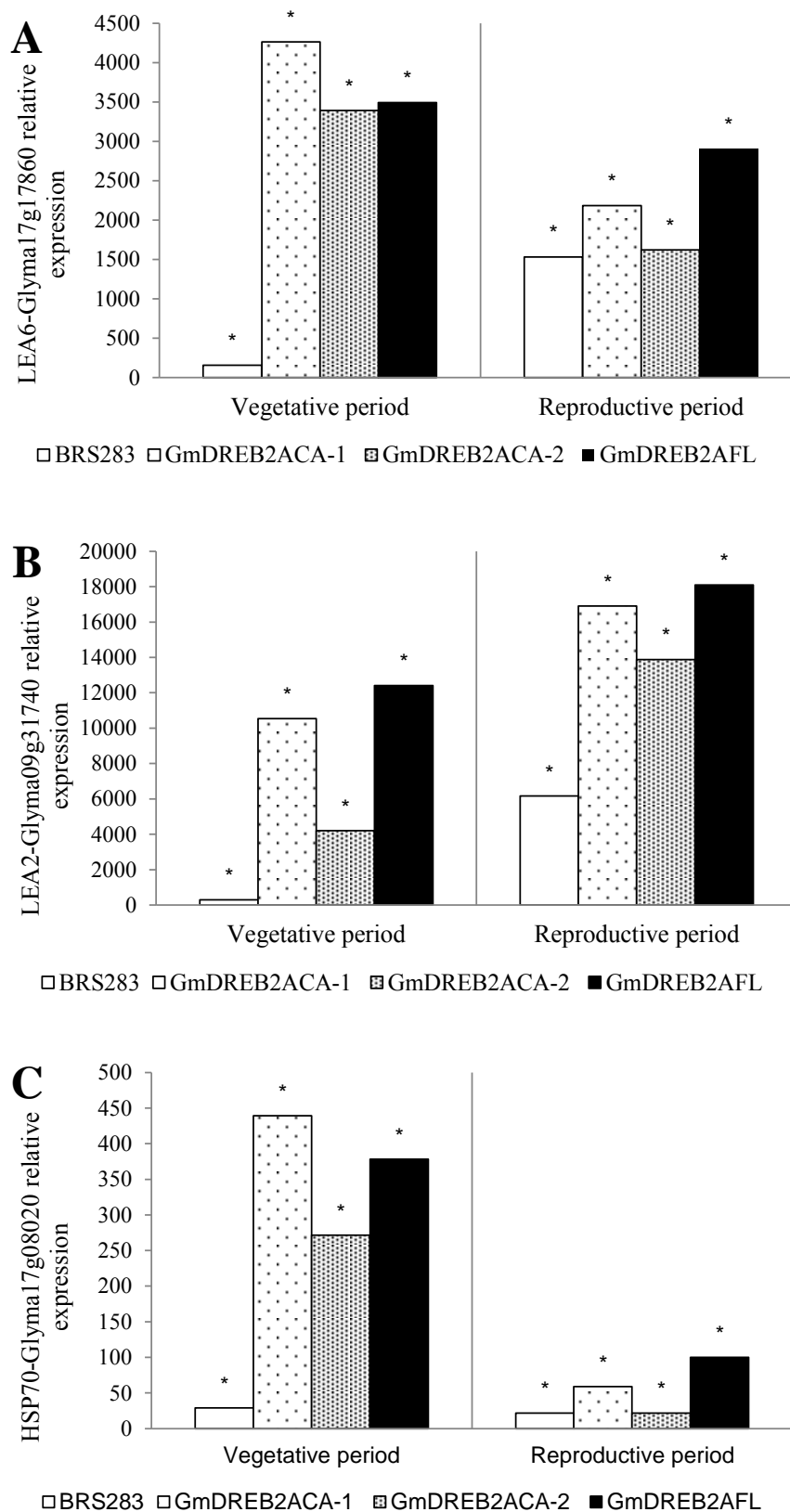


Figure 2 - Gene expression analyses. *LEA6* (A), *LEA2* (B) e *HSP70* (C) genes expression levels in genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 under water deficit in vegetative and reproductive developmental periods. The expression was calibrated with the expressions of the control condition samples. Significant differences between plants of the control condition and plants under water deficit were analyzed by the software REST 2009 ($*p \leq 0.05$) software, n=6.

Considering the heat shock protein gene (*HSP70-Glyma17g08020*) under water deficit in the vegetative period, higher expression levels were detected in GM events when compared to BRS 283 cultivar (Figure 2C). In this developmental period, GM events GmDREB2ACA-1 and GmDREB2AFL showed higher expression levels when compared to plants from BRS 283 cultivar and GM event GmDREB2ACA-2. The similar expression profile was observed for GM events and conventional cultivar under water deficit imposed in the reproductive period, but with relatively lower expression levels (Figure 2C).

2.3.3 Seedlings growth rate, in germination period, under osmotic treatment with polyethylene glycol

Under osmotic conditions, a reduction in growth rate was observed for total seedling length (Figure 3A) and root length (Figure 3B). However, for hypocotyl growth rate, no significant difference was observed (Figure 3C). For total seedling length, conventional cultivar BRS 283 presented a greater rate of growth reduction in response to osmotic stress, followed by GM event GmDREB2ACA-1, and finally GmDREB2ACA-2 and GmDREB2AFL events, which presented lower growth losses and did not differ statistically from each other (Figure 3A). For root growth, cultivar BRS 283 and GM event GmDREB2ACA-1 presented greater reductions of growth in relation to event GmDREB2AFL (Figure 3B). However, GM GmDREB2ACA-2 event did not present significant differences when compared to GmDREB2ACA-1 and GmDREB2AFL events (Figure 3C).

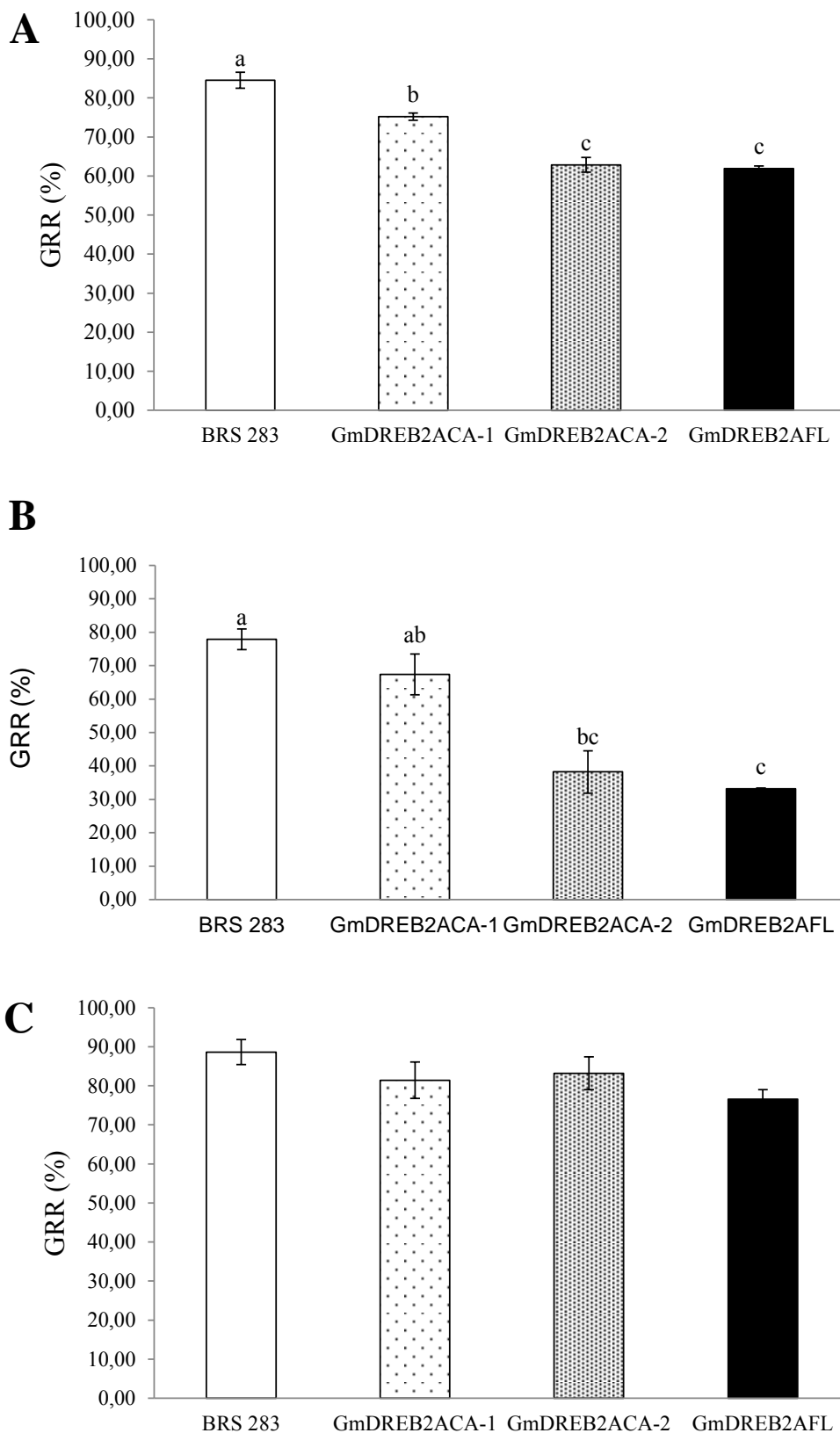


Figure 3 - Growth reduction rate (GRR), in germination phase, of seedlings, hypocotyl and root from soybean genetically modified (GM) events GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 and conventional cultivar BRS 283. (A) Total length of seedlings; (B) Root; (C) Hypocotyl growth reduction rate. Means ($n = 20$) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.3.4 Growth analysis of soybean plants under water deficit imposition in the vegetative developmental period

For growth data, genotype (Table 1) and water condition (Table 2) effects were observed for all variables analyzed: leaves dry matter (LDM), petioles dry matter (PDM), roots dry matter (RDM), total dry matter (TDM) and foliar area (FA) (Appendix B). When events were compared, it was observed that GmDREB2ACA-1 presented lower growth (LDM, PDM and TDM parameters) in relation to the other GM events and conventional cultivar (Table 1). GmDREB2ACA-2 and GmDREB2AFL events did not differ from the conventional cultivar in all growth parameters evaluated (Table 1), suggesting that the genetic transformation driven by the 35S constitutive promoter did not result in negative effects on the plants growth.

Table 1 - Growth parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283.

Genotype	LDM (g)	PDM (g)	RDM (g)	TDM (g)	FA (cm ²)
BRS 283	0.71±0.02a	0.58±0.02a	1.04±0.09a	2.34±0.10a	258.76±6.02a
GmDREB2ACA-1	0.55±0.03b	0.46±0.07b	0.87±0.07b	1.87±0.09b	226.10±7.88b
GmDREB2ACA-2	0.64±0.02a	0.54±0.02a	0.99±0.09ab	2.17±0.01a	244.52±6.15ab
GmDREB2AFL	0.64±0.01a	0.54±0.02a	0.97±0.07ab	2.15±0.08a	252.44±5.67a
CV (%)	13.91	11.59	14.56	10.30	9.51

LDM= leaves dry matter; PDM= petiole dry matter; RDM= roots dry matter; TDM= total dry matter; FA= foliar area. Means (n=9) ± standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

In addition, water deficit imposition triggered reductions in the mean values for variables LDM and FA but, on the other hand, increased root growth (Table 2).

Table 2 - Growth parameters of soybean plants under control and water deficit condition.

Water Condition	LDM (g)	PDM (g)	RDM (g)	TDM (g)	FA (cm ²)
C	0.66±0.02A	0.51±0.01B	0.67±0.02B	1.84±0.05B	253.13±4.71A
WD	0.61±0.02B	0.55±0.01A	1.26±0.04A	2.42±0.05A	237.78±4.89B
CV (%)	13.91	11.59	14.56	10.30	9.51

C=control; WD=water deficit; LDM= leaves dry matter; PDM= petiole dry matter; RDM= roots dry matter; TDM= total dry matter; FA= foliar area. Means (n=9) ± standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.3.5 Physiological responses of soybean plants transformed with GmDREB2ACA and GmDREB2AFL

For the analysis of physiological responses, plants from GM events and conventional cultivar BRS 283 were subjected to control and water deficit conditions. The water deficit was applied for a period of eight days, starting at V3 developmental stage. The ANOVA

results show water condition effect on gas exchanges measurements g_s , C_i , A , E , and interaction between water condition and genotype for A and E variables (Table 3) (Appendix C). Although the interaction was significant in ANOVA for E (Appendix C), it was not possible to detect differences for genotype effect when mean comparison test was performed, with differences being detected only for water status effect (Table 3).

Table 3 - Physiological parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283.

<i>g_s (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)</i>					<i>C_i (μmol CO₂ mol⁻¹)</i>					
	BRS 283	GmDREB2A CA-1	GmDREB2A CA-2	GmDREB2A FL	MEAN WC	BRS 283	GmDREB2A CA-1	GmDREB2A CA-2	GmDREB2A FL	MEAN WC
C	0.48±0.02	0.47±0.02	0.44±0.02	0.47±0.03	0.46±0.01 A	287.16±4.09	290.44±3.42	285.13±5.23	291.86±2.85	288.65±1.96 A
WD	0.02±0.00	0.08±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01 B	257.9±16.38	194.36±22.34	202.03±18.45	216.83±23.30	217.78±10.56 B
MEAN G	0.25±0.06NS	0.28±0.05NS	0.24±0.05NS	0.25±0.05NS		272.53±8.9NS	242.40±16.0NS	243.58±13.7 NS	254.34±14.6 NS	
CV (%)	18.51					16.50				
<i>A (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)</i>					<i>E (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)</i>					
	BRS 283	GmDREB2A CA-1	GmDREB2A CA-2	GmDREB2A FL	MEAN WC	BRS 283	GmDREB2A CA-1	GmDREB2A CA-2	GmDREB2A FL	MEAN WC
C	21.94±0.86Aa	21.69±0.80Aa	20.56±0.70Aa	21.30±0.46Aa	21.37±0.36A	5.87±0.17	5.88±0.14	5.43±0.27	5.82±0.16	5.75±0.10A
WD	1.38±0.60Bb	5.52±0.63Ba	4.65±0.22Ba	4.01±1.27Bab	3.89±0.54B	0.68±0.09	0.97±0.08	1.16±0.17	1.04±0.18	0.96±0.07B
MEAN G	11.66±2.55B	13.61±2.02A	12.60±2.05AB	12.65±2.20AB		3.27±0.64NS	3.42±0.60NS	3.29±0.54NS	3.43±0.59NS	
CV (%)	17.40					14.02				

C= control; WD= water deficit; MEAN G= genotypes mean; MEAN WC= mean of water condition; CV=coefficient of variance; NS= not significant; *g_s*= stomatal conductance; *C_i*= CO₂ intercellular concentration; *A*= photosynthetic rate; *E*= transpiration rate. Means (n= 9) ± standard error followed by similar uppercase letters (between water conditions) and lowercase letters (among genotypes) do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

The water deficit imposition resulted in a sharp reduction for all gas exchange parameters (g_s , C_i , A and E) (Table 3). For g_s and C_i parameters, results indicate a lower performance of conventional cultivar BRS 283 when compared to GM events under water deficit treatment (Table 3), however, the interaction between genotypes and water conditions was not significant. Similarly, the stomatal conductance rate of cultivar BRS 283 also showed a lower trend compared to GM events (Table 3). In contrast, the CO_2 intercellular concentration was higher in conventional cultivar when compared to the GM events (Table 3).

BRS 283 conventional cultivar displayed photosynthetic rate of $1.38 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, while GM events showed rates between 4.01 and $5.52 \mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, with higher values for GmDREB2ACA-1 and GmDREB2ACA-2 events (Table 3). For this parameter, although event GmDREB2AFL did not presented significant differences when compared to BRS 283 cultivar, it the values obtained for this genotype were closer to GmDREB2ACA-1 and GmDREB2ACA-2 events (Table 3).

2.3.6 Water deficit tolerance test with GM plants in vegetative developmental period

Differences between the events and conventional cultivar were observed for relative growth rate (RGR), leaves dry matter (LDM), green foliar area (GFA) and root dry matter (RDM) (Table 4). In general, the BRS 283 conventional cultivar presented inferior performance when compared to GM events (GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2, GmDREB2AFL). Among the GM events, soybean plants transformed with the *GmDREB2AFL* construction showed higher LDM, GFA and RDM values (Table 4).

Table 4 - Growth parameters of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit tolerance test.

Genotype	RGR (%)	GLDM (g)	GFA (cm ²)	RDM (g)
BRS 283	13.12±1.39b	0.24±0.04c	60.33±10.78c	0.82±0.02ab
GmDREB2ACA-1	20.38±1.64a	0.49±0.05b	124.51±13.00b	0.86±0.02ab
GmDREB2ACA-2	23.24 ±1.59a	0.52±0.05b	123.54±12.58b	0.81±0.02b
GmDREB2AFL	20.47±1.43a	0.87±0.07a	197.97±15.00a	0.88±0.02a
CV (%)	35.67	42.94	45.73	10.15

RGR= relative growth rate; GLDM= green leaves dry matter; GFA= green foliar area; RDM= roots dry matter; CV=coefficient of variance. Means (n = 20) ± standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

After 19 days of withheld irrigation followed by eight days of rehydration, GmDREB2AFL event presented higher green foliar area (GFA) values when compared to GmDREB2ACA-1 and GmDREB2ACA-2 events (Table 4). A smaller green leaf area was observed in conventional cultivar BRS 283 (Figure 4).

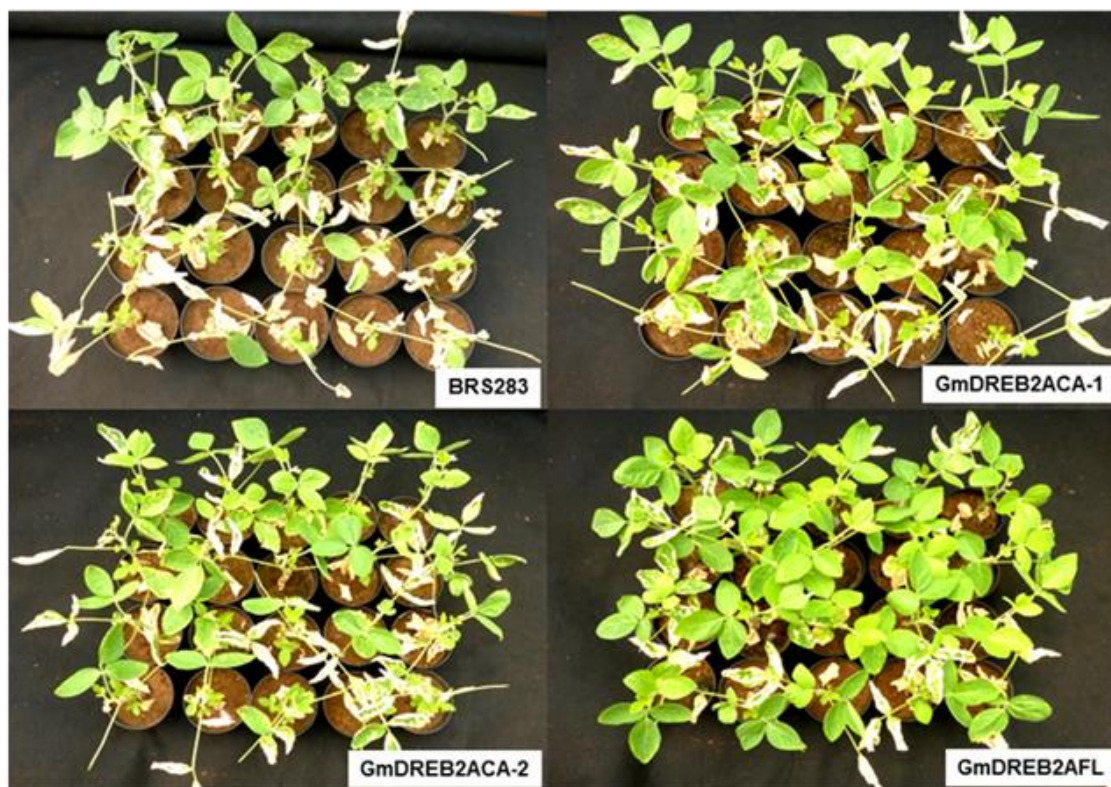


Figure 4 - Test of water deficit tolerance in genetically modified plants (GmDREB2AFL and GmDREB2ACA) and conventional cultivar (BRS 283). Photo was recorded after 19 days of water restriction followed by eight days of re-irrigation, the number of days required until plants presented an evident recovery from water deficit treatment.

Daily transpiration data, assayed along water deficit tolerance test, revealed that in the beginning of the test, 2 to 3 days after the suspension of irrigation, conventional BRS 283 cultivar showed superior transpiration in relation to the transgenic events (Figure 5). As a consequence of this higher initial water loss, there was a pronounced reduction of available water in the substrate (Figure 6), resulting in a lower availability of water in subsequent phases. For GM events, daily transpiration profiles were similar for all three events (Figure 5). From the eighth day of treatment, water loss stabilized and GM events and conventional cultivar presented similar daily transpiration profiles until the end of the treatment (Figure 5).

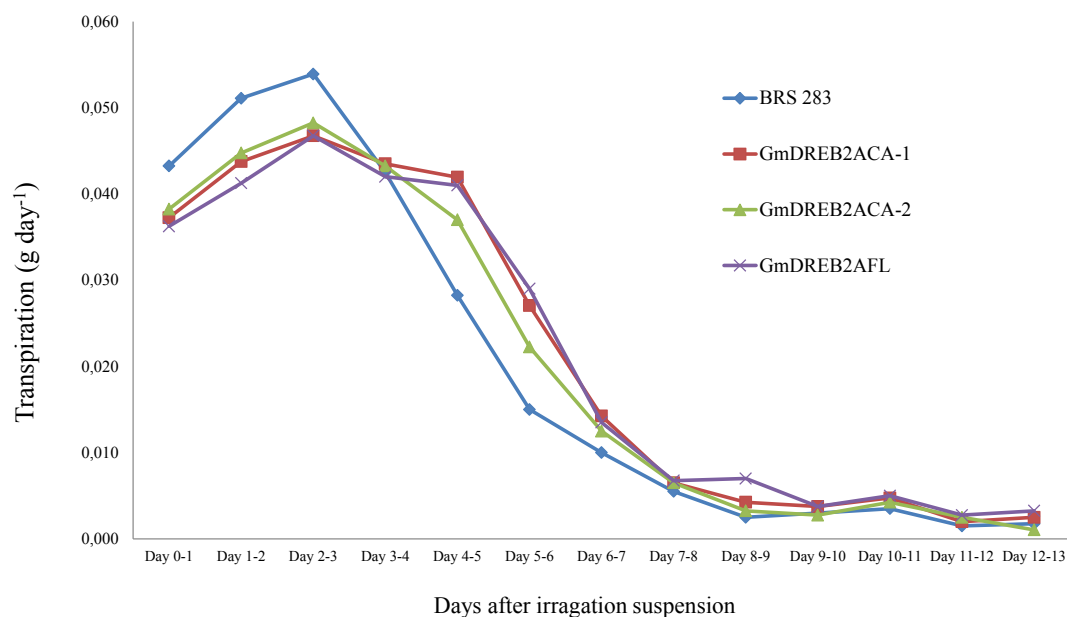


Figure 5 - Daily transpiration of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, under water deficit. Values represent means (n = 20).

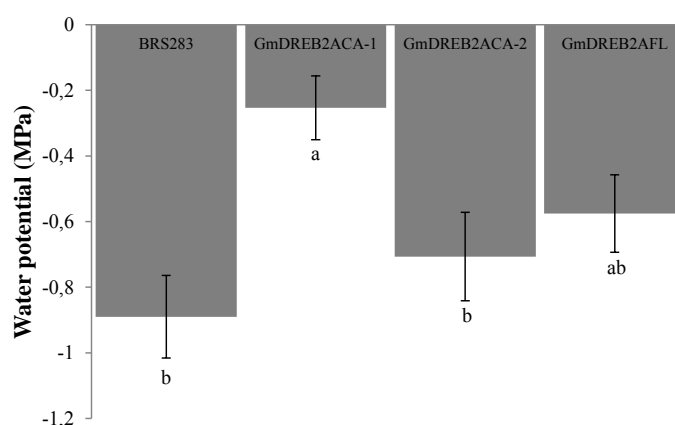


Figure 6 - Substrate water potential of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, under water deficit. Means (n = 9) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.3.7 Analysis of yield components in GM plants, under water deficit, in the vegetative and reproductive periods

When a water deficit was imposed in the vegetative developmental period, results showed that stressed plants presented a significant reduction in the relative water content (RWC) compared to the control (Figure 7). However, for total number of pods (TNP), total pods dry matter (TPDM), total number of seeds (TNS), total seed dry

matter (TSDM) no genotype (Table 5) and water condition (Table 6) effects were observed (Appendix D).

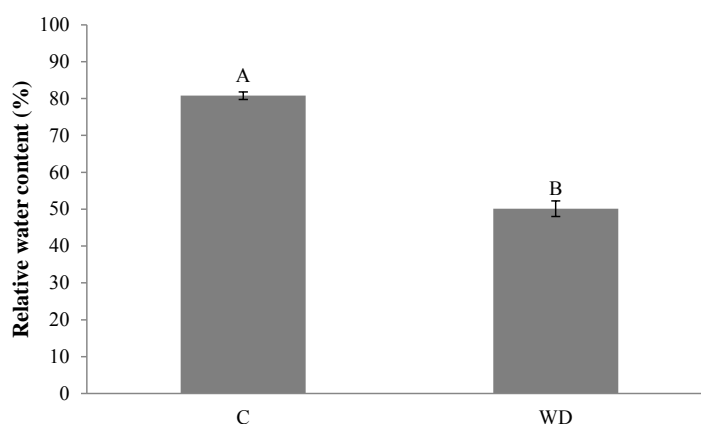


Figure 7 - Water relative content of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, in vegetative period, under control (C) (irrigated) and water deficit (WD). Means (n = 6) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by equal letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

Table 5 - Yield components of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the vegetative period.

Genotype	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
BRS 283	124.59±6.05NS	49.51±3.16NS	255.58±17.81NS	37.22±1.58NS
GmDREB2ACA-1	116.42±6.49NS	49.01±2.08NS	255.75±11.77NS	34.79±1.43NS
GmDREB2ACA-2	104.48±5.89NS	44.92±2.22NS	235.33±10.16NS	32.04±1.58NS
GmDREB2AFL	102.42±6.96NS	46.57±2.46NS	229.00±13.43NS	32.22±1.60NS
CV (%)	19.23	19.59	20.62	15.45

TNP= total number of pods; TPDM= total pods dry matter; TNS= total number of seeds; TSDM= total seeds dry matter; CV=coefficient of variance; NS= not significant. Means (n=6) ±standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

Table 6 - Yield components of soybean plants under control and water deficit in the vegetative period.

Water Condition	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
C	111.50±4.21NS	47.82±1.82NS	244.04±9.71NS	34.82±1.13NS
WD	112.42±5.30NS	47.19±1.73NS	243.79±9.74NS	33.32±1.16NS
CV (%)	19.23	19.59	20.62	15.45

TNP= total number of pods; TPDM= total pods dry matter; TNS= total number of seeds; TSDM= total seeds dry matter; CV=coefficient of variance; NS= not significant. Means (n=6) ±standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

When water deficit was imposed in the reproductive developmental period, significant interaction between soybean genotypes and water condition was observed for the RWC parameter (Appendix E). In the control condition, the lower RWC was observed for the GmDREB2AFL event (Figure 8). The effect of water deficit occurred for all GM events and conventional cultivar, which presented reduction in RWC in this condition (Figure 8).

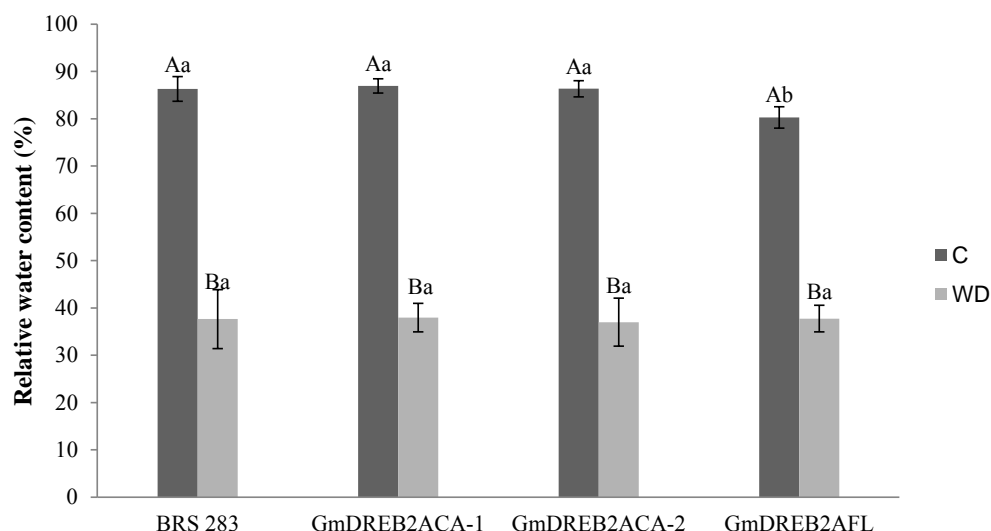


Figure 8 – Water relative content of genetically modified plants GmDREB2AFL and GmDREB2ACA, and conventional cultivar, BRS 283, in reproductive period, under control (irrigated) and water deficit (WD). Means ($n = 6$) and standard error, represented by columns and bars respectively, followed by similar uppercase letters (between water conditions) and lowercase letters (among genotypes) do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

For yield components (TNP, TPDM, TNS and TSDM), there was no significant interaction between water condition and genotypes (Appendix E). The genotype effect was significant for TPDM and TSDM variables (Table 7). GmDREB2AFL event showed the highest yield per plant (represented by the TSDM and TPDM) (Table 7), whereas GmDREB2CA-1 event presented lower values for TPDM and TSDM compared to the other GM events, related to the lower growth observed for this event (Table 1). Water deficit presented a negative effect in all yield components variables evaluated (Table 8).

Table 7 - Yield components of soybean plants genetically modified with GmDREB2AFL and GmDREB2ACA and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the reproductive period.

Genotype	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
BRS 283	98.25±8.98NS	47.81±3.21ab	217.33±19.89NS	33.81±2.17ab
GmDREB2ACA-1	92.25±8.24NS	43.47±3.33b	208.33±20.32NS	30.98±2.36b
GmDREB2ACA-2	103.67±7.99NS	44.59±2.55ab	217.92±17.79NS	31.27±1.71ab
GmDREB2AFL	102.00±9.87NS	52.21±3.74a	228.58±24.44NS	36.09±2.46a
CV (%)	26.19	14.76	22.81	13.84

TNP= total number of pods; TPDM= total pods dry matter; TNS= total number of seeds; TSDM= total seeds dry matter; CV=coefficient of variance; NS= not significant. Means ($n=6$) ±standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

Table 8 - Yield components of soybean plants genetically modified with *GmDREB2AFL* and *GmDREB2ACA* and conventional cultivar BRS 283, submitted to water deficit in the reproductive period.

Water Condition	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
C	113.00±5.48A	55.29±1.80A	267.38±11.42A	38.78±1.16A
DH	85.08±5.37B	38.76±1.35B	168.71±8.61B	27.32±0.89B
CV (%)	4.85			

TNP= total number of pods; TPDM= total pods dry matter; TNS= total number of seeds; TSDM= total seeds dry matter; C= control; WC= water condition. CV=coefficient of variance. Means (n=6) ±standard error followed by the same letters do not differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.4 DISCUSSION

DREB2A transcription factors play several roles in plants and participate in various pathways during responses to abiotic stresses (CHEN et al., 2016). Several studies indicate that the overexpression of DREB2A proteins in plants is effective in increasing tolerance to abiotic stresses (LIU et al., 2008, MIZOI et al., 2013, ENGELS et al., 2013). The overexpression of *VuDREB2A* in cowpea and *GmDREB2A* in *Arabidopsis* resulted in increased tolerance to water deficit (MIZOI et al. 2013; SADHUKHAN et al., 2014). The expression of *OsDREB2A* in GM rice also contributed to improved tolerance to water deficit, as GM plants presented higher survival rate under water deficit when compared to wild-type plants (CUI et al., 2011). In our study, the relative expression of *GmDREB2A* gene in GM events in comparison to untransformed plant (conventional cultivar BRS 283) demonstrated that the transformation resulted in increased expression of this gene in all events obtained. These data confirm the induction of *GmDREB2A* transgene expression driven by the cauliflower mosaic virus 35S promoter (*35SCaMV*).

Our data also show that under control conditions the relative expression level of the *GmDREB2A* gene was higher than in the water deficit condition, highlighting differences in the gene relative expression between the two imposed water conditions (control and water deficit). Considering that the soybean possesses an endogenous copy of the *GmDREB2A* gene in its genome, in the present study, the expression data obtained for this gene in the transgenic events were calibrated by the expression obtained by *GmDREB2ACA* and *GmDREB2AFL* in order to evaluate the overexpression of genes introduced by genetic transformation in the conventional cultivar, which carries only the endogenous gene. Thus, the reduction in the relative expression level by water deficit imposition may be in part attributed to the activation of the endogenous *GmDREB2A* gene expression in BRS 283 in response to stress.

Expression levels of LEA proteins in GM plants indicate that TF GmDREB2A induced expression of these proteins under water deficit conditions (Figures 2A and 2B). LEA2 and 6 are Dehydrins (DHNs) which typically accumulate at seed maturation stages and in plant tissues in response to drought, high salinity, low temperature, or treatment with abscisic acid (ABA) (BATTAGLIA et al., 2008). The contribution of dehydrins in abiotic stresses tolerance in plants occurs mainly due to their protective effects on lipid membranes (BAO et al., 2017). Koag et al. (2009) have identified that the interaction of such proteins with lipids in the membrane or with partially denatured proteins helps to protect cells against damages caused by low water potential.

Previous works evaluated the expression of some dehydrin in response abiotic stresses. In *Olea europaea* var. *sylvestris* (wild olive plant), the expression *OesDHN* was induced under mild drought stress. Furthermore, Arabidopsis transgenic plants showed a better tolerance to osmotic stress, suggesting that *OesDHN* expression is induced by drought but is also able to confer osmotic stress tolerance (CHIAPPETTA et al., 2015). In grapevine, *DHN1* and *DHN2* genes were induced by drought, cold, heat, embryogenesis, as well as the application of ABA, salicylic acid (SA), and methyl jasmonate (MeJA) (YANG et al., 2012). Specifically, soybeans genetically modified with ABA dependent and independent transcriptional factors such as *AtAREB1*, *AtDREB1* and *AtDREB2A*, *AtGOLS2* isolated from *A. thaliana* showed high expression levels of *LEA2* and *LEA6* genes under water deficit imposed in both greenhouse and field conditions (HONNA et al., 2016, FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017), corroborating the results obtained in the present study.

The expression analysis results showed that the transgenic and conventional plants (BRS 283) responded to water deficit in the vegetative and reproductive periods, since they exhibited an increase in transcript levels of the responsive genes in relation to the control condition (Figure 2). The results of the transcript analysis also showed that GmDREB2 and conventional plants (conventional cultivar BRS 283) showed similar profiles for the induction of the different stress-related genes evaluated (Figure 2). However, the expression patterns varied depending on the developmental periods and genotypes.

The overexpression of TF *DREB2ACA* in transgenic Arabidopsis resulted in increased drought tolerance and also activated genes induced by water deficit or thermal stress (SAKUMA et al. 2006a, 2006b). In previous studies, under dehydration experimental the overexpression of GmDREB2AFL in Arabidopsis plants resulted in a

lower activation of *HSP70* (*Heat Shock Protein 70*) gene in relation to wild-type plants, while the overexpression of GmDREB2ACA resulted in a marked increase in the level of *HSP70* transcripts (MIZOI et al., 2013). A high expression level for this gene was also identified in GM event GmDREB2ACA-1 in response to water deficit imposed in the vegetative developmental period. In the reproductive period, however, the expression level decreased for all soybean plants evaluated; during this period, GmDREB2AFL event showed higher expression of *HSP70* gene when compared to GmDREB2ACA events (Figure 2C), demonstrating that the development period interferes in the responses mediated by the different gene constructs.

In germination phase, the hypocotyl length on seedlings showed no differences in response to the osmotic treatment imposed with -0.2MPa of PEG-8000 (Figure 3C). In a different way, marked differences were found for root length and total length of seedlings, in which the events GmDREB2ACA-2 and GmDREB2AFL presented superior performance. These results can be explained due to the few modifications present in this embryonic tissue (hypocotyl) under water restriction conditions. Among the tests used to distinguish genotypes more adapted to such adverse conditions as drought, root length has been considered the most sensitive to differentiate physiological quality of cultivars (VANZOLINI et al. 2007), as has seedling length, a good measure to identify more adapted genotypes (VIEIRA et al., 2013). Our results suggested that the insertion of TFs GmDREB2AFL and GmDREB2ACA did not compromise soybean seed quality and may improve drought tolerance in seeds.

For growth parameters evaluated in the vegetative period, GmDREB2ACA-1 event showed inferior development in relation to the other genotypes. The overexpression of *DREB2ACA* in *Arabidopsis* plants also induced growth disturbances, activation of stress-induced genes, and increased drought tolerance (SAKUMA et al., 2006a). As with GmDREB2ACA-1, GmDREB2A genes exhibited strong gene induction under water deficit condition and caused negative effects during germination and in transgenic *Arabidopsis* seedlings (MIZOI et al., 2013). Microarray and expression analyses in *Arabidopsis* overexpressing *ZmDREB2A-S* and *AtDREB2C* genes revealed that many genes induced by water deficit were up-regulated in transgenic plants even under control conditions (QIN et al., 2007; LEE et al., 2010), which may be related to the growth retardation observed in the GmDREB2ACA-1 event. In addition, our data show that in the vegetative period there was a prioritization of root growth in detriment to aerial growth in all GM events and conventional cultivar

under water deficit, a strategy commonly observed in plants subjected to drought. Chen et al. (2014) stated that when plants undergo water deficit, their roots send chemical signals to maintain root growth, which contribute to drought tolerance through the search for far water resources.

Physiological data assayed in this study showed that water deficit imposition resulted in an accentuated reduction of gas exchange parameters. These results are consistent with several studies, which also observed that water restriction tends to reduce rates of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration (JALEEL et al., 2009, ENGELS et al., 2013, QUAIN et al. 2014). According to Mutava et al. (2015), the reduction in stomata opening results in a decline in the amount of CO₂ assimilated in the leaf, and this may cause a progressive suppression of photosynthesis. Thus, the accumulation of internal CO₂ observed in conventional cultivar BRS 283 probably resulted from reduced CO₂ utilization in the photosynthesis process. The assimilation rates in photosynthetic leaves decrease due to the reduction of photosynthetic metabolites and enzymatic activity, low carboxylation efficiency and inhibition of chloroplast activity under low water potential (LAWLOR; TEZARA, 2009). Among other co-factors of water deficit, damages on the photosynthetic apparatus also occur by the production of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide and hydroxyl radicals (LISAR et al., 2012). The physiological responses of GM plants, especially photosynthetic rate, indicated a better physiological performance under water restriction (Table 1). Drought conditions lead to a deficit in photosynthetic rate caused by stomata and non-stomata limitations (WISE et al., 1992; YORDANOV et al., 2003). Therefore, the low values of photosynthetic rate found in the conventional cultivar BRS 283 might have contributed to its lower tolerance, reflected in a lower green area.

The differences registered in transpiration rates between plant genotypes at the beginning of irrigation suspension led to a better water status in the substrates containing GmDREB2ACA-1 and GmDREB2AFL events, at the end of the experimental period. Thus, from 4-5 days, these plants had higher transpiration rates when compared to GmDREB2ACA-2 and BRS 283 plants (Figure 5). The substrate water potential data corroborate gas exchange analyses, where transpiration rate was higher in GmDREB2ACA-2 event and in conventional cultivar BRS 283. In addition, the conventional cultivar showed a higher initial water loss (Figure 5), which may be related to the greater sensitivity of this genotype to the water deficit imposition as observed in Figure 4. Even being more affected by water deficit conditions when

compared to GM events, the conventional cultivar BRS 283 survived after nineteen days under water deficit conditions showing a greater tolerance compared to other soybean conventional cultivars. In previous experiments conducted by our group under same experimental conditions, the conventional cultivar BR 16 presented 100% mortality in seventeen days without irrigation (MARINHO et al., 2016).

Our data indicate that the highest water potential in the GmDREB2ACA-1 substrate, observed at the end of the experimental period (Figure 6), may be due to the smaller size of the plants. Tuberosa (2012) stated that such water conservation mechanism could be considered advantageous for long periods of water restriction, since water stored in the soil can be made available for use in later periods.

In general, when soybean plants are submitted to water deficit for short periods of time during the vegetative period, the crop usually recovers without any damage to yield (SONG et al., 2016). The same way, our data did not present differences for the yield components during the vegetative period, confirming that this period did not affect soybean plants yield under drought. However, when water restriction is imposed for long periods, it may affect not only photosynthesis, as observed in the present study (Table 3), but also height and leaf area index (CHAVARRIA et al., 2015). In addition, the water requirements of soybean plants increase progressively as the crop develops. The maximum demand occurs during flowering and in the beginning of pod formation, remaining high until physiological maturation (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

Considering yield parameters in the reproductive period, GM event GmDREB2AFL presented higher values of TPDM and TSDM (Table 7), which corroborates data from the water deficit tolerance test and also indicated this GM event as the one with the best performance under water deficit. These data suggest that it is possible to obtain soybean lines GM with TF GmDREB2A with minor damages in final yields, which is extremely desired when considering a grain crop, such as soybean.

In the present study, the overexpression of TFs GmDREB2AFL and GmDREB2ACA in soybean induced the expression of drought-responsive genes such as *LEA* and *HSP70*, under water deficit imposed in both vegetative and reproductive developmental periods. Seedlings from soybean plants genetically modified with TFs GmDREB2AFL and GmDREB2ACA kept growth in osmotic treatment during germination and also showed a better performance in physiological and growth parameters under water deficit during the vegetative period, suggesting a tolerance to drought. Additional experiments in field conditions may allow further characterization

of these GM lines, adding information on their responses under water limiting conditions.

2.5 REFERENCES

- ALMOGUERA, C.; PRIETO-DAPENA, P.; DIAZ-MARTIN, J.; ESPINOSA, J.M.; CARRANCO, R.; JORDANO, J. The HaDREB2A transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. **BMC Plant Biology**, v.9, p.1-12, 2009
- AKHTAR, M.; JAISWAL, A.; AHMAD, E.; JAISWAL, J.P.; QURESHI, M.I.; TUFCHI, M.; KUMAR, A.; SINGH, N.K. Molecular cloning and characterization of a cold-induced gene encoding DRE-binding transcription factor from cold-arid adapted ecotype of *Lepidium latifolium* L. *Indian Journal of Biotechnology*, v.14, p.26-32, 2015.
- BAO, F.; DU, D.; AN, Y.; YANG, W.; WANG, J.; CHENG, T.; ZHANG. Overexpression of *Prunus mume* dehydrin genes in tobacco enhances tolerance to cold and drought. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-12, 2017.
- BATTAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAS, A.A. The enigmatic lea proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, v.148, p.6–24, 2008.
- CASALI, N.; PRESTON, A. *E. coli* plasmid vectors. **Plasmid**, v.235, p.55-69, 2003.
- CHAVARRIA, G.; DURIGON, M.R.; KLEIN, V.A.; KLEBER, H. Photosynthetic restriction of soybean plants under variation of water availability. **Ciência Rural**, v.45, p.1387-1393, 2015.
- CHEN, X.; CHEN, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; CHENG, B.; XIANG, Y. Genome-wide analysis of soybean hd-zip gene family and expression profiling under salinity and drought treatments. **PLoS ONE**, v.9, n.2, p.1-17, 2014.
- CHEN, H.; LIU, L.; WANG, L.; WANG, S.; CHENG, X. VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, v.129, p.263–273, 2016.
- CHIAPPETTA, A.; MUTO, A.; BRUNO, L.; WOLOSZYNSKA, M.; MLIJSEBETTENS, M.V.; BITONTI, B.M. A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in Arabidopsis transgenic plants. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.1-15, 2015.
- CUI, M.; ZHANG, W.; ZHANG, Q.; XU, Z.; ZHU, Z.; DUAN, F.; WU, R. Induced over-expression of the transcription factor *OsDREB2A* improves drought tolerance in Rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.1384-1391, 2011.
- DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *OsDREB*

genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v.33, p.751-763, 2003.

ENGELS, C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; MARIN, S.R.R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; KANAMORI, K.; MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A.L. Genetics and Molecular Biology, 36, 4, 556-565 (2013) Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in leaves and roots during dehydration. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n.4, p.556-565, 2013.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Ames, Yowa: Yowa State University of Science and Technology**, Cooperative Extension Service, n.80, p.11, 1977.

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

FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L.C. RODRIGUES, F.A.; MOLINARI, H.B.C.; MARIN, S.R.R.; MOLINARI, M.D.C.; MARCOLINO-GOMES, J.; MERTZ-HENNING, L.M.; FARIAS, R.B.; OLIVEIRA, M.C.N.; NEUMAIER, N.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; MIZOI, J.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A.L. Characterization of soybean genetically modified for drought tolerance in field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-15, 2017.

GUO, J.; WANG, M-H. Expression profiling of the DREB2 type gene from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under various abiotic stresses. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v.52, p.105-111, 2011.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, California: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Circular: 347, 1950.

HONNA, P.T., FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FERREIRA, L.C.; MOLINARI, M.D.C.; MARIN, S.R.R.; OLIVEIRA, M.C.N., FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; MERTZ-HENNING, L.M.; KANAMORI, N.; NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; URANO, K.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; DESIDÉRIO, J.A.; NEPOMUCENO. Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with *AtGolS2* gene for drought tolerance. **Molecular Breeding**, v.36, n.157, p.1-17, 2016.

HOOD, E.E.; GELVIN, S.B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, v.2, p.208-218, 1993.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H.J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.11, n.1, 2009.

- KIDOKORO, S.; WATANABE, K.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; HTWE, N.M.P.S.; FUJITA, Y.; SEKITA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v.81, p.505-518, 2015.
- KOAG, M-C.; WILKENS, S.; FENTON, R.D.; RESNIK, J.; VO, E.; CLOSE, T.J. The K-Segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. **Plant Physiology**, v.150, p.1503-1514, 2009.
- LAWLOR, D.W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v.103, p.561-579, 2009.
- LEE, S.J.; KANG, J.Y.; PARK, H.J.; KIM, M.D.; BAE, M.S.; CHOI, H.I.; KIM, S.Y. DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. **Plant Physiology**, v.153, p.716–727, 2010.
- LISAR, S.Y.S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M.M.; RAHMAN, I.M.M. Water stress in plants: causes, effects and responses. In *Water Stress*: Rahman, M. Hasegawa, H., In Tech: Rijeka, Croatia, pp. 1–14, 2012.
- LIU, L.; ZUH, K.; YANG, Y.; WU, J.; CHEN, F.; YU, D. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthem avestitum*). **Journal of Plant Research**, v.121, n.2, p.215-226, 2008.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- MARCO, F., BITRIÁN, M., CARRASCO, P., RAJAM, M. V., ALCÁZAR, R., & TIBURCIO, A. F. Genetic engineering strategies for abiotic stress tolerance in plants. In B. Bahadur, M. V. Rajam, L. Sahijram, & K. V. Krishnamurthy (Eds.), **Plant Biology and Biotechnology** (pp. 579–609), 2015.
- MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F.A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; NAKAYAMA, T.J.; REIS, R.R.; FARIAS, J.R.B.; HARMON, F.G.; MOLINARI, H.B.C.; MOLINARI, M.D.C.; NEPOMUCENO, A.L. Transcriptome-Wide Identification of Reference Genes for Expression Analysis of Soybean Responses to Drought Stress along the Day. **PLoS ONE**, v.10, n.9, p.1-16, 2015.
- MIZOI, J.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; KIDOKORO, S.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; KUSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *GmDREB2A;2*, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is post translational regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. **Plant Physiology**, v.161, p.346-361, 2013.
- MUNDSTOCK, C.M.; THOMAS, L.A. Soybeans: factors affecting the growth and yield. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.31, 2005.

MUTAVA, R.N.; PRINCE, S.J.K.; SYED, N.H.; SONG, L.; VALLIYODAN, B.; CHEN, W.; NGUYEN, H.T. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p.109-120, 2015.

PAZ, M.M.; MARTINEZ, J.C.; KALVIG, A.B.; FONGER, T.M.; WANG, K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. **Plant Cell Reporter**, v.25, p.206–213, 2006.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, p.1-10, 2002.

QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN L.S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **Plant Journal**, v.50, p.54-69, 2007.

QUAIN, M.D.; MAKGOPA, M.E.; MARQUEZ-GARCIA, B.; COMADIRA, G., FERNANDEZ-GARCIA, N.; OLMOS, E.; SCHNAUBELT, D.; KUNERT, K.J.; FOYER, C.H. Ectopic phytocystatin expression leads to enhanced drought stress tolerance in soybean (*Glycine max*) and *Arabidopsis thaliana* through effects on strigolactone pathways and can also result in improved seed traits. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, p.903-913, 2014.

SADHUKHAN, A.; KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; TOKIZAWA, M.; YAMAMOTO, Y.Y.; IUCHI, S.; KOYAMA, H.; PANDA, S.K.; SAHOO, L. *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.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**, v.18, p.1292-1309, 2006a.

SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. 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 of the United States of America**, v.103, p.18822-18827, 2006b.

SINGH, K. B., FOLEY, R. C., AND ONATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress response. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p430-436, 2002.

SONG, L.; PRINCE, S.; VALLIYODAN, B.; JOSHI, T.; SANTOS, J.V.M.; WANG, J.; LIN, L.; WAN, J.; WANG, Y.; XU, D.; NGUYEN, H.T. Genome-wide transcriptome analysis of soybean primary root under varying water-deficit conditions. **BMC Genomics**, v.17, p.1-17, 2016.

- TAN, D.X.; TUONG, H.M; THUY, V.T.T.; SON, L.V.; MAU, C.H. 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.
- TERASHIMA, A.; TAKUMI, S. Allopolyploidization reduces alternative splicing efficiency for transcripts of the wheat *DREB2* homolog, *WDREB2*. **Genome**, v.52, p.100-105, 2009.
- TUBEROSA, R. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. **Frontiers in Physiology**, v.3, p.1-26, 2012.
- USDA, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, March 2018. World agricultural supply and demand estimates. Online Database (<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/wasde/wasde-03-08-2018.pdf>).
- VANZOLINI, S.; ARAKI, C.A.S.; SILVA, A.C.T.M; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n.2, p.90-96, 2007.
- VIEIRA, F.C.F; SANTOS, C.D.J.; NOGUEIRA, A.P.O.; DIAS, A.C.C.; HAMAWAKI, O.T.; BONETTI, A.M. Physiological and biochemical aspects of soybean cultivars submitted to water deficit induced by peg 6000. **Bioscience Journal**, v.29, p.543-552, 2013.
- VILLELA, F. A.; BECKERT, O. P. Potencial osmótico de soluções aquosas de Polietileno Glicol 8000. *Revista Brasileira de Sementes*, v.23, n. 1, p. 267-275, 2001.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A.; Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v.218, p.1-14, 2003.
- WISE, R.R; ORTIZ-LOPEZ, A.; ORT, D.R. Spatial distribution of photosynthesis during drought in field-grown and acclimated and non acclimated growth chamber-grown cotton. **Plant Physiology**, v.100, p.26-32, 1992
- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., et al. (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. **BMC Plant Biol.** 12:140. doi: 10.1186/1471-2229-12-140
- YORDANOV, I.V.; VELIKOVA, T.T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Plant Physiology**, edição especial, p.187-206, 2003.

2.6 COMPLEMENTARY MATERIAL

Appendix–A - Identification and sequence of primer used in gene expression analyses.

Genes		Primer F e R
¹ <i>GmDREB2A</i>	Glyma14g06080	F- TGATGAGTCTGCGTTGATGC R- TCCCAACAACCTTGGCATCTG
¹ <i>LEA 2</i>	Glyma09g31740	F- GGTAGACAGCATTCTAGTGG R- TACCATAGACACCGGTAGTT
¹ <i>LEA 6</i>	Glyma17g17860	F- AAAGGCACAGAGTGATGAAT R- CTTGATGACCTTGTGTACCA
¹ <i>HSP70</i>	Glyma17g08020	F- TTTCGGGTTTGAATGTGTTG R- AGGTCAAAGATAAGCACGTT
² <i>ELF1-β</i>	Glyma13g04050	F- GTTGAAAAGCCAGGGGACA R- TCTTACCCCTTGAGCGTGG
² <i>FYVE</i>	Glyma13g17500	F- TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG R- GATCCCTCATCCATACATTTTCAG

1 Analysis of gene expression; 2 Endogenous control.

Appendix B - Resume of variance analysis performed for growth parameters: LDM (leaves dry matter), PDM (petiole dry matter), RDM (roots dry matter), TDM (total dry matter) and FA (foliar area).

	Mean square					
	DF	LDM (g)	PDM (g)	RDM (g)	TDM (g)	FA (cm ²)
Blocks	8					
G	3	0.08*	0.05*	0.09*	0.64*	3607.31*
WC	1	0.04*	0.02*	6.30*	6.02*	4238.75*
GxWC	3	0.00	0.01	0.03	0.08	866.95
Residual	56	0.01	0.00	0.02	0.05	545.19
CV (%)		13.91	11.59	14.56	10.30	9.51
Mean		0.64	0.53	0.97	2.13	245.46

G=Genotypes; WC= water condition.; CV=coefficient of variance; DF= degrees of freedom. * Significant according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Appendix C - Resume of variance analysis performed for physiological: g_s (stomata conductance), C_i (CO_2 intercellular concentration), A (photosynthetic rate), E (transpiration rate).

Mean square					
	DF	g_s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$)	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Blocks	8				
G	3	0.00	3504.15	11.40	0.13
WC	1	3.12*	90397.52*	5504.80*	412.42*
GxWC	3	0.01	3800.18	20.60*	0.66*
Residual	56	0.00	1744.82	4.83	0.22
CV (%)		18.51	16.50	17.40	14.02
Mean		0.26	253.21	12.63	3.335

G=Genotypes; WC= water condition; CV=coefficient of variance, DF= degrees of freedom. *Significant according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Appendix D - Resume of variance analysis for evaluated parameters after water deficit imposed in the vegetative stage in soybean plants genetically modified for drought tolerance (GmDREB2AFL and GmDREB2ACA) and conventional cultivar (BRS 283): RWC (relative water content), TNP (total number of pods), TPDM (total pods dry matter), TNS (total number of seed); TSDM (total seeds dry max).

Mean square						
	DF	RWC (%)	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
Blocks	5					
G	3	32.58	1309.26	55.28	2289.28	71.97
WC	1	11291.47*	10.03	4.78	0.75	26.82
GxWC	3	4.61	194.40	5.36	420.81	17.03
Residual	35	71.68	463.33	86.56	2528.85	27.70
CV (%)		12.95	19.23	19.59	20.62	15.45
Mean		65.40	111.96	47.50	243.92	34.07

G=Genotypes; WC= water condition.; CV=coefficient of variance; DF= degrees of freedom. * Significant according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Appendix E - Resume of variance analysis for evaluated parameters after water deficit imposed in the reproductive period in soybean plants genetically modified for drought tolerance (GmDREB2AFL and GmDREB2ACA) and conventional cultivar (BRS 283): RWC (water relative content), TNP (total number of pods), TPDM (total pods dry matter), TNS (total number of seed); TSDM (total seeds dry max).

Mean square						
	LD	RWC (%)	TNP	TPDM (g)	TNS	TSDM (g)
Blocks	5					
G	3	28.47*	307.58	184.37*	823.58	69.26*
WC	1	26935.53*	9252.08*	3277.90*	116821.33*	1577.13*
GxWC	3	31.66*	1851.81	95.66	4938.72	36.17
Residual	35	8.84	673.06	48.16	2473.79	20.93
CV (%)		4.85	26.19	14.76	22.81	13.84
Mean		61.26	99.04	47.02	218.04	33.05

G=Genotypes; WC= water condition.; CV=coefficient of variance. * Significant according to the Tukey test ($p \leq 0.05$).

3 CAPÍTULO 3: OSCILAÇÕES METABÓLICAS EM FOLHAS E RAÍZES DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA COM OS GENES *GmDREB2AFL* e *GmDREB2ACA* SOB DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

O déficit hídrico está entre os principais estresses abióticos que afetam o crescimento e a produtividade das plantas. GmDREB2A é um importante fator de transcrição envolvido na regulação das respostas das plantas sob restrição hídrica. Em estudos anteriores eventos de soja contendo GmDREB2AFL (*Glyma14g06080*) e GmDREB2ACA apresentaram alta tolerância em relação a cultivar não transformada (BRS 283) após déficit hídrico severo. Neste trabalho, a análise por ¹H-RMN foi realizada com o objetivo de elucidar as alterações metabólicas em raízes e folhas de plantas de soja geneticamente modificadas (GMs) submetidas ao estresse abiótico de déficit hídrico. Os resultados indicaram diferentes respostas entre folhas e raízes de todos os genótipos, com prevalência de acúmulo de metabólitos em folhas. Dentre as vias metabólicas afetadas pelo déficit hídrico, o metabolismo de carboidratos e de aminoácidos destacou-se nos genótipos deste estudo. Os resultados da análise metabólica indicaram que as plantas dos eventos GmDREB2AFL e GmDREB2ACA-1 possuem diferentes ajustes metabólicos em relação a cultivar não transformada, com destaque para β-glicose e frutose em folhas e β-glicose, frutose, asparagina e fenilalanina em raízes, sugerindo superioridade das plantas de soja GMs em resposta ao estresse por restrição hídrica.

Palavras-chave: Fator de transcrição. DREB2A. *Glycine max*. Respostas metabólicas. Seca. Tolerância.

3.1 INTRODUÇÃO

A soja é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo. Sua produção ocupa uma área de aproximadamente 126 milhões de hectares e representa cerca de 350 milhões de toneladas (USDA, 2018). Os estresses ambientais, como a seca e o calor, são ameaças constantes ao cultivo de soja para vários países que cultivam a oleaginosa, causando perdas de bilhões de dólares a cada ano (DAS et al., 2017).

Nas plantas, o estresse gera redução de crescimento e desenvolvimento, que são ocasionados pela desregulação da homeostase metabólica (SHULAEV et al., 2008). Com isso, mudanças nas vias metabólicas celulares (CHEBROLU et al., 2016; CLARKE et al., 2013; LI et al., 2015; RABARA et al., 2017; SILVENTE et al., 2012) ocorrem em níveis de metabolismo de carboidratos, aminoácidos e peptídeos (HUANG; GAO, 2000) em um esforço de maximizar o crescimento e os processos de desenvolvimento com a finalidade de reestabelecer a homeostase celular (GUY et al., 2008). Compreender a resposta global das plantas aos estresses abióticos que ocorrem a nível metabólito é fundamental para definir estratégias biotecnológicas e de melhoramento genético que permitam aumentar a tolerância das plantas de soja ao estresse (JORGE et al., 2015).

A metabolômica engloba inúmeras ferramentas para investigar as respostas metabólicas das plantas aos estresses abióticos, particularmente à seca, inundação, alta salinidade e temperaturas extremas (calor e frio). A ressonância magnética nuclear (RMN) é considerada uma importante ferramenta na metabolômica vegetal e pode ser utilizada para detectar e quantificar o impacto metabólico induzido pela seca ou outros estresses ambientais (CHARLTON et al., 2008; BLIGNY; DOUCE, 2001).

As células vegetais percebem estímulos de estresse por diversos sensores que, por sua vez, ativam as vias de sinalização envolvendo mensageiros secundários, hormônios das plantas, transdutores de sinal e reguladores de transcrição (CVIKROVÁ et al., 2013; DANQUAH, et al., 2014; GILROY et al., 2014). Vários sinais, portanto, convergem para a regulação de genes estresse-induzidos que codificam proteínas e enzimas diretamente envolvidas no metabolismo do estresse, contribuindo para a especificidade da resposta de aclimação a um determinado estímulo de estresse (CASARETTO et al., 2016). Entre os principais mecanismos celulares que regulam a aclimação de plantas a condições ambientais adversas estão os fatores de transcrição (FTs) de resposta ao estresse (ZANDALINAS et al., 2018). Estudos sobre a regulação

transcricional de seca e alta salinidade mostraram que vias dependentes de ácido abscísico (ABA) podem ser mediadas por FTs da família AREB/ABF (*ABA-Responsive Element Binding protein/ ABRE-Binding Factor*) e vias independentes podem ser mediadas por FTs da família CBF/DREB (*C-repeat Binding Factor/Dehydration Responsive Element Binding*) (YOSHIDA et al., 2014).

FTs DREB desempenham papel fundamental na via de transdução do sinal de estresse da planta, pois podem se ligar especificamente ao elemento DRE (G/ACCGAC) e ativar a expressão de muitos genes estresse-induzidos (AGARWAL, et al., 2006). O fator de transcrição *GmDREB2A* (*Glyma14g06080*) é um gene ortólogo de *AtDREB2A* identificado em soja que possui função e maquinaria reguladora do DREB2 conservada entre *Arabidopsis thaliana* e soja. Em plantas de *Arabidopsis*, *GmDREB2A* foi ativado por seca, calor e baixa temperatura (MIZOI et al., 2013). Contudo, como observado em estudos prévios com *Arabidopsis*, a superexpressão de *GmDREB2A* não induz a expressão de genes alvos, indicando que modificações pós-transcricionais são necessárias para ativar as proteínas DREB2A (SAKUMA et al., 2006). Experimentos identificaram uma região de domínio de regulação negativa em DREB2A e uma modificação neste domínio (DREB2ca) induziu genes estresse-responsivos e melhorou a tolerância à seca em *Arabidopsis* (SAKUMA et al. 2006, MIZOI et al., 2013).

Em estudos prévios do nosso grupo eventos transgênicos de soja contendo o gene *GmDREB2AFL* (*Glyma14g06080*) e também sua forma ativa *GmDREB2ACA* apresentaram melhor desempenho sob condições de déficit hídrico em comparação ao *background* não transformado. Inúmeros trabalhos já foram realizados, a fim de, investigar as alterações fisiológicas e moleculares resultantes da inserção do gene DREB nas mais variadas espécies. Por outro lado, o perfil metabólico desses materiais mais tolerantes ainda não foi determinado. Uma abordagem mais abrangente para investigar as alterações no metabolismo desses eventos geneticamente modificados (GMs) em comparação ao *background* sob condição de déficit hídrico, pode fornecer informações úteis para a definição de novas estratégias que visem o desenvolvimento de plantas mais tolerantes.

Portanto, este trabalho visa determinar as alterações metabólicas em raízes e folhas de plantas de soja GMs com o gene *GmDREB2AFL* e sua forma ativa *GmDREB2ACA*, sob déficit hídrico, comparando com o *background* não transformado, a cultivar BRS 283.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e condições experimentais

Sementes dos genótipos de soja (*Glycine max* L. Merr.), nomeadas GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2, GmDREB2AFL (eventos geneticamente modificados) e da cultivar BRS 283 (background convencional) foram germinadas em papel umedecido com volume de água equivalente a duas vezes e meia o peso do papel seco por 96h em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 100% de umidade relativa. Subsequentemente, as plântulas foram transferidas para vasos de 1 L preenchidos com a mistura substrato:areia (1:1), sendo o substrato constituído de terra:areia:composto orgânico (3:2:2), de modo que cada vaso conteve uma única plântula. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial (4 x 2), sendo os quatro genótipos e as duas condições hídricas (controle – C, déficit hídrico - DH). Foram utilizadas três repetições biológicas, sendo cada repetição constituída por um *bulk* de duas plantas.

As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura programada a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz e receberam irrigação para manutenção do substrato a 100% da capacidade de campo até que os tratamentos de estresse fossem impostos. O estresse por déficit hídrico foi imposto por suspensão de irrigação quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V3 (FEHR et al., 1977). Após o início do estresse, as plantas foram monitoradas diariamente em relação à condutância estomática (*gs*) até atingirem valores de *gs* inferiores a $200 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (FLEXAS et al., 2004), totalizando oito dias sob déficit hídrico. Um conjunto de plantas foi mantido sob irrigação e representou o grupo controle. Ao final do período do estresse, amostras de folhas do terceiro trifólio e de raiz foram coletadas, embaladas separadamente em folhas de alumínio, sendo imediatamente imersas em nitrogênio líquido, armazenadas a -80°C , liofilizadas e moídas para as análises metabólicas.

3.2.2 Preparo das soluções e das amostras para análise de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os extratos dos tecidos em estudo (raízes e folhas) foram obtidos a partir de 30 mg do tecido macerado e 1,00 mL de $\text{CD}_3\text{OD} : \text{D}_2\text{O}$ (80:20 v / v) contendo TSP- d_4 -sal

de sódio de ácido trimetilsililpropiónico a 0,264 mmol, homogeneizado durante 30 segundos em vórtex e depois aquecidos a 50 °C durante 10 minutos a 2000 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos, e 600 µL do sobrenadante resfriado a 4 °C durante 30 minutos. Então, 20 µL de tampão de fosfato à 2,40 mM foi adicionado a cada amostra e adicionaram-se 20 µL de tampão de fosfato 2,40 mM a cada extrato (COUTINHO et al., 2016; WARD et al., 2003; COROL et al., 2014). Ao final, as amostras foram armazenadas a 4 °C *overnight* antes das análises e 600 µL de cada extrato foi transferido para tubo de RMN.

3.2.3 Instrumentação

Os extratos foram analisados empregando RMN de ¹H. Os espectros foram adquiridos a 298 K em espectrômetro Avance III HD a 600 MHz e equipados com sonda BBO de 5 mm. Os espectros de prótons foram adquiridos usando a sequência de pulso NOESY 1D com tempo de pré-saturação de 1,50 e tempo de aquisição de 3,64 s (64 k pontos), acumulação de 256 transientes e largura espectral de 15 ppm. Todos os FID sofreram transformação de Fourier após a aplicação da função de janela exponencial com alargamento de linha de 0,3 Hz. As correções de fase e de linha de base foram realizadas no software TopSpin. Os deslocamentos químicos de RMN de ¹H foram referenciados para TSP-d4 a δ 0,00. Os espectros 1D das folhas de soja foram atribuídos usando as seguintes estratégias de identificação: i) Os espectros de RMN de ¹H foram identificados usando base de dados pública (Human Metabolome Database - HMDB e bem como a versão RMN Suite Professional avaliada 8.1, *Chenomx*). As anotações foram confirmadas com espectros de RMN 2D (espectroscopia de correlação - COZY, correlação quantitativa única heteronuclear - HSQC, HMBC, TOCSY e 2D J-Resolvido).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Metabólitos identificados pela análise RMN ¹H nos eventos GMs e na cultivar BRS 283

Por meio da análise de RMN foi possível identificar um grande número de metabólitos alterados em raízes e folhas das plantas GMs e da cultivar convencional,

sob condições de estresse por déficit hídrico. Realizou-se a identificação e quantificação de 27 metabólitos, dentre eles: 11 aminoácidos, sete ácidos orgânicos, seis açúcares e três outros de classificação variada. O deslocamento químico e a constante de acoplamento dos metabólitos identificados podem ser visualizados no Apêndice A.

3.3.2 Análise de Componentes Principais (ACP)

Por meio da ACP foi possível determinar o efeito dos tratamentos (genótipos e condição hídrica), em função das alterações metabólicas observadas em folhas e raízes de soja sob déficit hídrico. Foram considerados os resultados de dois componentes principais, componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2) (Figura 1).

Em folhas, os PC1 e PC2 explicaram respectivamente 57,44% e 12,69% (Figura 1A) da variância associada, enquanto em raízes o PC1 explicou 46,97% e o PC2 12,95% (Figura 1A). Considerando os resultados de folha, pelo PC1 foi possível detectar a formação de dois grupos, sendo um grupo formado pelas plantas na condição controle e outro pelas plantas sob déficit hídrico, já pelo PC2 foram separados os genótipos. A discriminação dos genótipos foi observada apenas na condição de déficit hídrico, sendo que a cultivar convencional BRS 283 foi a que mais se distanciou dos demais genótipos GMs (Figura 1A).

Em raízes, da mesma forma que para folhas, por meio de PC1 foram formados dois grupos sendo um das amostras sob controle e outro sob déficit hídrico. Pelo PC2 a discriminação dos genótipos ocorreu apenas na condição controle, onde a cultivar convencional foi a que mais se distanciou dos demais genótipos (Figura 1B).

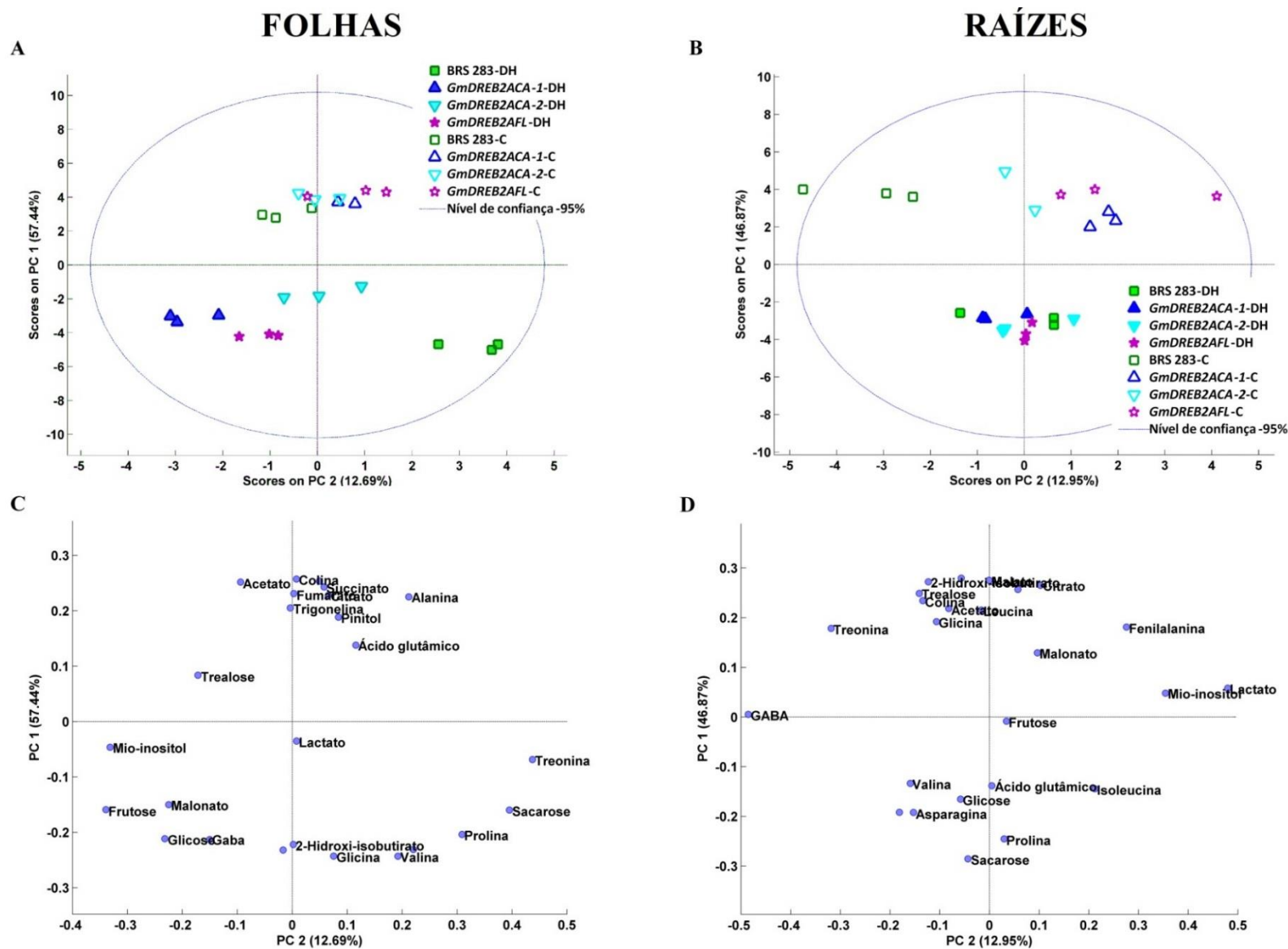


Figura 1 - Análise de componentes principais (ACP) de 27 metabólitos dos eventos geneticamente modificados (GMs) da soja GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e da cultivar convencional BRS 283 sob condição controle (C) e déficit hídrico (DH). Score (A) e loading plot (C) das amostras de folhas. Score (B) e loading plot (D) das amostras de raízes.

Nas figuras 1C e 1D estão distribuídos os metabólitos, em função da sua contribuição na formação desses agrupamentos. A separação entre as amostras foliares de plantas controle e estressadas ao longo do eixo PC1 foi principalmente atribuída ao acetato, colina, succinato, glicina, valina, β -glicose, gaba, 2-hidroxi-isobutirato, prolina, como mostrado na plotagem complementar de ACP (Figura 1C). Em relação à separação dos genótipos GMs e cultivar BRS 283, as amostras de folhas de plantas sob déficit hídrico foram separadas ao longo de PC2 devido aos metabólitos mio-inositol, frutose, β -glicose, malonato, treonina, sacarose e prolina (Figura 1C). Em raízes, os metabólitos 2-hidroxi-isobutirato, citrato, malato, trealose, sacarose, prolina e asparagina apresentaram importância crucial na separação de amostras das condições controle e estressada (Figura 1D). Por outro lado, a separação entre os genótipos na condição controle é devido à variação nos níveis dos metabólitos gaba, treonina, lactato, mio-inositol e fenilalanina (Figura 1D).

3.3.3 Análise de variância dos metabólitos identificados

O presente estudo revelou que o déficit hídrico produziu efeitos variados sobre o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e outros metabólitos tanto em folhas quanto em raízes nos genótipos GMs e na cultivar convencional de soja BRS 283. Para obter um perfil detalhado do comportamento de cada um dos metabólitos identificados, realizou-se a análise de variância com o propósito de identificar os efeitos de genótipo, condição hídrica e da interação (genótipo x condição hídrica) em folhas (Apêndice B) e raízes (Apêndice C). As variáveis para as quais se observou interação entre fatores estão apresentadas na forma de gráficos enquanto que os efeitos simples de genótipo e condição hídrica estão descritos em tabelas.

3.3.3.1 Efeito do déficit hídrico no metabolismo de carboidratos

Nos tecidos de folha, para os compostos pertencentes ao metabolismo dos carboidratos, observou-se efeito de interação para os metabólitos sacarose, frutose, β -glicose, trealose, mio-inositol e pinitol (Apêndice B). Durante o déficit hídrico houve aumento significativo nas quantidades de sacarose, frutose, β -glicose, mio-inositol e pinitol nas folhas das plantas de soja, para todos os genótipos GMs e também para

cultivar BRS 283, comparado à condição controle (Figura 2). Sob déficit hídrico, os níveis de trealose nas folhas foram maiores apenas para os eventos GMs GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL (Figura 2D), além disso, estes mesmos genótipos destacaram-se com níveis superiores de frutose (Figura 2B), β -glicose (Figura 2C) e trealose (Figura 2D) em relação ao evento GM GmDREB2ACA-2 e à cultivar convencional BRS 283. Por outro lado, a cultivar BRS 283 apresentou maiores teores de sacarose (Figura 2A) e pinitol (Figura 2F) quando comparada às cultivares GMs em situação de restrição hídrica. Sob condição controle, os níveis de sacarose, β -glicose, mio-inositol e pinitol mantiveram-se estáveis nas folhas entre todos os genótipos, enquanto que os níveis de frutose foram maiores no genótipo BRS 283 em relação aos genótipos GMs (Figura 2). O genótipo GmDREB2AFL apresentou os menores níveis de trealose em relação a cultivar convencional BRS 283 e aos eventos GmDREB2ACA sob condição controle (Figura 2D).

FOLHAS

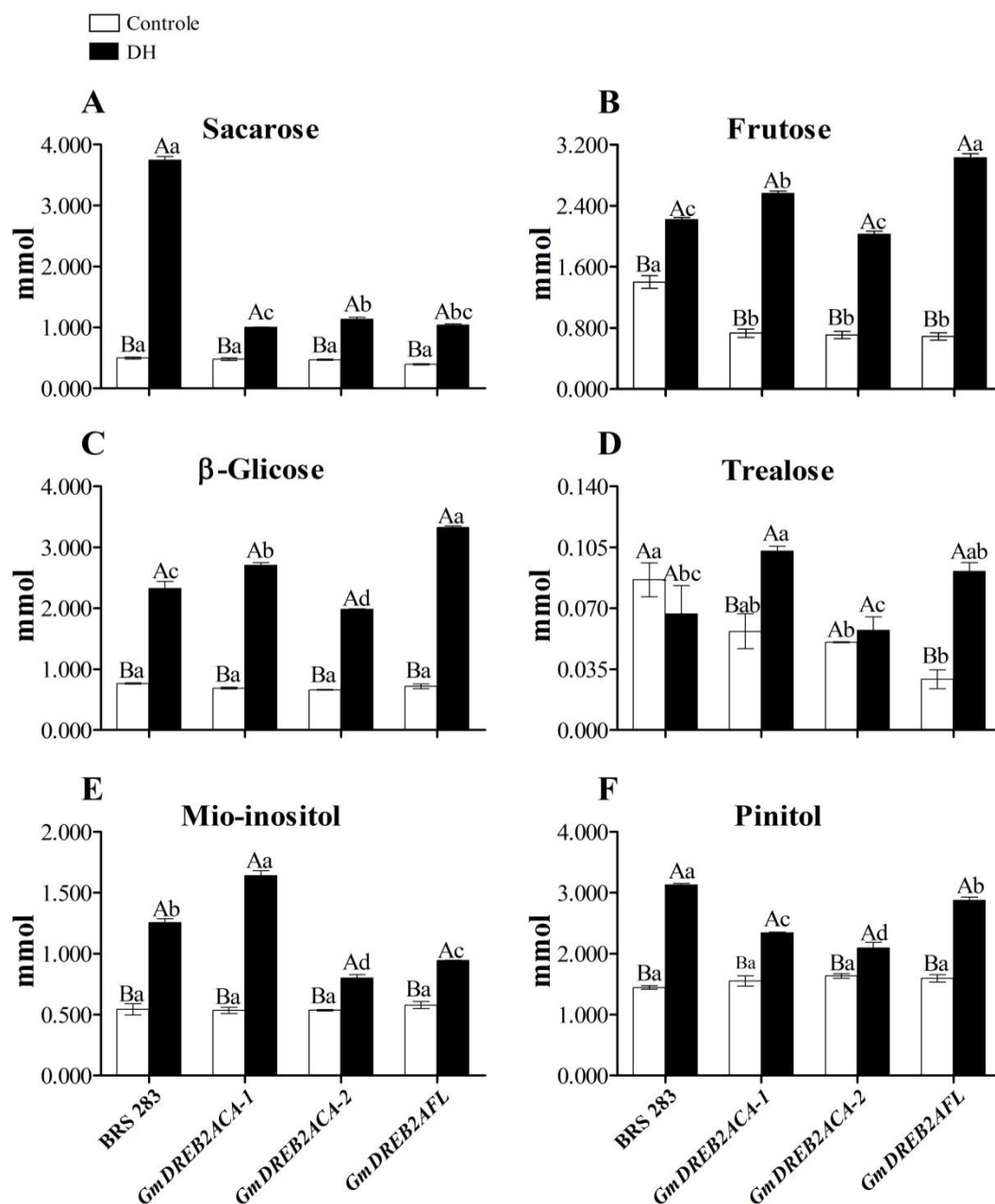


Figura 2 – Teor de carboidratos em folhas dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias ($n = 6$) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O efeito de condição hídrica foi detectado em folhas para ácido glutâmico, lactato e malonato (Tabela 1). Esses metabólitos apresentaram aumento de concentração em função do estresse imposto.

Tabela 1 - Nível dos metabólitos (mmol) encontrados em folhas e raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) que apresentaram efeito simples de condição hídrica.

	METABÓLITOS	MÉDIAS	
		C	DH
Folhas	Ácido glutâmico	0,217±0,021B	0,306±0,031A
	Lactato	0,018±0,002B	0,035±0,003A
	Malonato	0,070 ±0,036B	0,230±0,044A
Raízes	Alanina	0,026±0,001B	0,029±0,001A
	Citrato	0,606±0,069A	0,181±0,010B
	Colina	0,283±0,005A	0,177±0,006B
	Fenilalanina	0,029±0,003A	0,017±0,001B
	Leucina	0,051±0,002A	0,037±0,002B
	Malato	4,475±0,309A	2,937±0,100B
	Malonato	0,938±0,199A	0,407±0,090B
	Sacarose	0,798±0,056B	3,056±0,125A
	Succinato	0,251±0,006A	0,083±0,004B
	Treonina	0,058±0,005A	0,040±0,004B

C= controle; DH= déficit hídrico. Médias (número de repetições = 6) ± erro padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$).

Em raízes, apenas para as variáveis β -glicose e trealose foi observado o efeito de interação (Apêndice C). Após a imposição do déficit hídrico, os níveis de β -glicose aumentaram significativamente nos eventos GMs GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL em relação à condição controle (Figura 3A). Esses eventos também tiveram maiores níveis desse açúcar em comparação a cultivar convencional BRS 283 e ao evento GmDREB2ACA-2, que não mostraram alterações após o estresse (Figura 3A). A concentração de trealose em raízes foi menor sob déficit hídrico quando comparada à condição controle para todos os genótipos (Figura 3B). As plantas controle apresentaram os níveis de trealose significativamente menores no evento GmDREB2ACA-1, enquanto que as plantas estressadas mostraram maiores níveis desse açúcar no evento GmDREB2AFL em comparação à cultivar convencional BRS 283 (Figura 3B).

RAÍZES

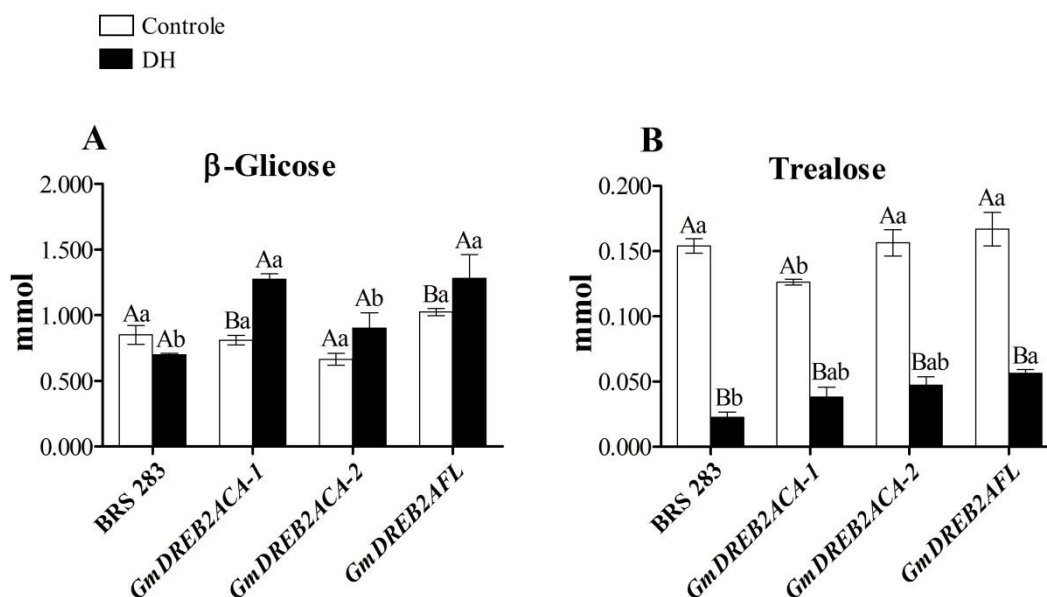


Figura 3 – Teor de carboidratos em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias ($n = 6$) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ainda nas raízes, o efeito de condição hídrica foi observado para o acúmulo de sacarose em todos os genótipos, que apresentaram teores significativamente maiores sob déficit hídrico (Tabela 1). O efeito de genótipo foi encontrado para frutose nas plantas do evento GmDREB2AFL que tiveram maior concentração desse açúcar nas raízes em relação ao evento GmDREB2ACA-2 e à cultivar convencional BRS 283 (Tabela 2). Os demais açúcares detectados nas raízes (sacarose, frutose, mio-inositol) não mostraram significância para nenhum dos efeitos (Apêndice C).

Tabela 2 - Nível dos metabólitos (mmol) encontrados em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) que apresentaram efeito simples de genótipo.

METABÓLITOS	MÉDIAS			
	BRS 283	GmDREB2ACA-1	GmDREB2ACA-2	GmDREB2AFL
Fenilalanina	0,015±0,002b	0,027±0,004 ^a	0,023±0,003ab	0,026±0,005a
Frutose	0,994±0,080c	1,468±0,073ab	1,149±0,053bc	1,555±0,131a
Malonato	0,706±0,290ab	1,156±0,206 ^a	0,256±0,081b	0,571±0,099ab
Valina	0,023 ±0,001b	0,032±0,002 ^a	0,030±0,003ab	0,025±0,001ab

Médias (número de repetições = 6) ± erro padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3.3.2 Efeito do déficit hídrico no metabolismo de aminoácidos

Quanto à categoria dos aminoácidos, em folhas as variáveis que apresentaram efeito de interação estão apresentadas na Figura 4. As folhas de todos os genótipos GMs e da cultivar BRS 283 apresentaram aumento nos níveis dos aminoácidos prolina, glicina, isoleucina, leucina, valina e gaba na situação de estresse (Figura 4). Para alanina (Figura 4A), apenas a cultivar BRS 283 mostrou nível significativamente maior desse composto sob déficit hídrico quando comparado ao controle. Quanto a treonina (Figura 4F), além da cultivar BRS 283 o genótipo GmDREB2ACA-2 também apresentou aumento em relação à condição controle. Ademais, sob déficit hídrico, a cultivar BRS 283 mostrou-se superior aos eventos GMs quanto aos teores dos aminoácidos quantificados nas folhas (Figura 4), com exceção de leucina (Figura 4E) e gaba (Figura 4H). Entre os genótipos GMs, para os compostos isoleucina, prolina, leucina, glicina e valina, o evento GmDREB2AFL destacou-se com maiores teores em relação aos eventos GmDREB2ACA-1 e GmDREB2ACA-2 (Figura 4).

FOLHAS

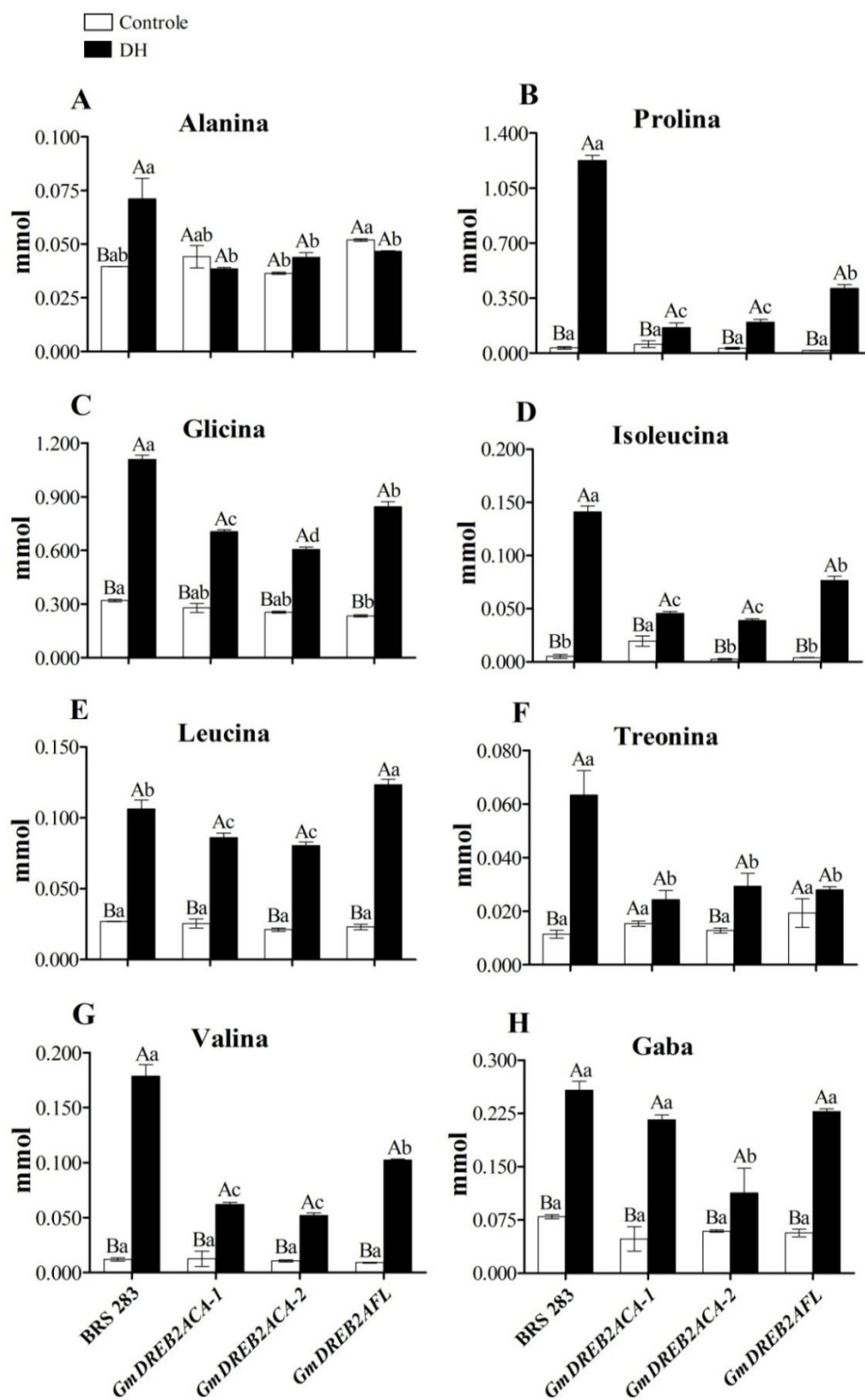


Figura 4 – Teor de aminoácidos em folhas dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente,

seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação às raízes, houve efeito de interação apenas para o aminoácido asparagina (Apêndice C). Após a exposição ao déficit hídrico, as raízes dos eventos GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL apresentaram aumento nas concentrações de asparagina em relação à condição controle, e também diferiram com valores significativamente maiores da cultivar convencional BRS 283 e do evento GmDREB2ACA-2 (Figura 5). Sob condição controle, observou-se que as raízes do evento GmDREB2ACA-2 apresentaram menor nível de asparagina em comparação às raízes do evento GmDREB2ACA-1 (Figura 5).

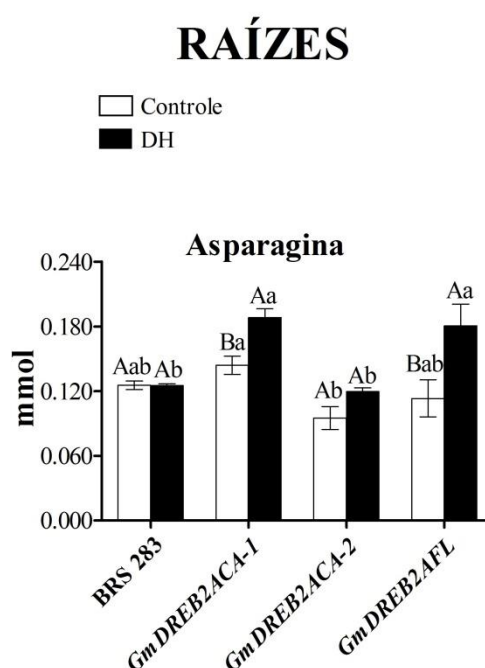


Figura 5 – Teor de asparagina em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias ($n = 6$) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação aos demais aminoácidos, o efeito simples de condição hídrica foi significativo para leucina, treonina, fenilalanina e alanina (Tabela 1). Sendo que houve redução da concentração dos compostos leucina, treonina e fenilalanina e aumento nos níveis de alanina nas raízes de todos os genótipos sob déficit hídrico (Tabela 1). O efeito simples de genótipo foi observado para valina e fenilalanina (Tabela 2). Os

eventos GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL possuíram teor superior de fenilalanina e o evento GmDREB2ACA-1 de valina e em relação à cultivar BRS 283 (Tabela 2).

3.3.3.3 Efeito do déficit hídrico nos níveis de ácidos orgânicos e demais metabólitos identificados

Nas folhas, efeito da interação foi significativo para os metabólitos acetato, citrato, fumarato, succinato, colina, 2-hidroxi-isobutirato e trigonelina (Apêndice B). Sob condição controle as folhas do evento GmDREB2AFL apresentaram teor significativamente menor de acetato em relação ao evento GmDREB2ACA-1, não diferindo dos demais genótipos (Figura 6A). Após a imposição do déficit hídrico, menores níveis de acetato foram detectados em relação à condição controle, exceto para o evento GM GmDREB2AFL que não sofreu alteração e, junto aos eventos GmDREB2ACA-1 e GmDREB2ACA-2, apresentou teores significativamente maiores em relação a cultivar convencional BRS 283 (Figura 6A).

FOLHAS

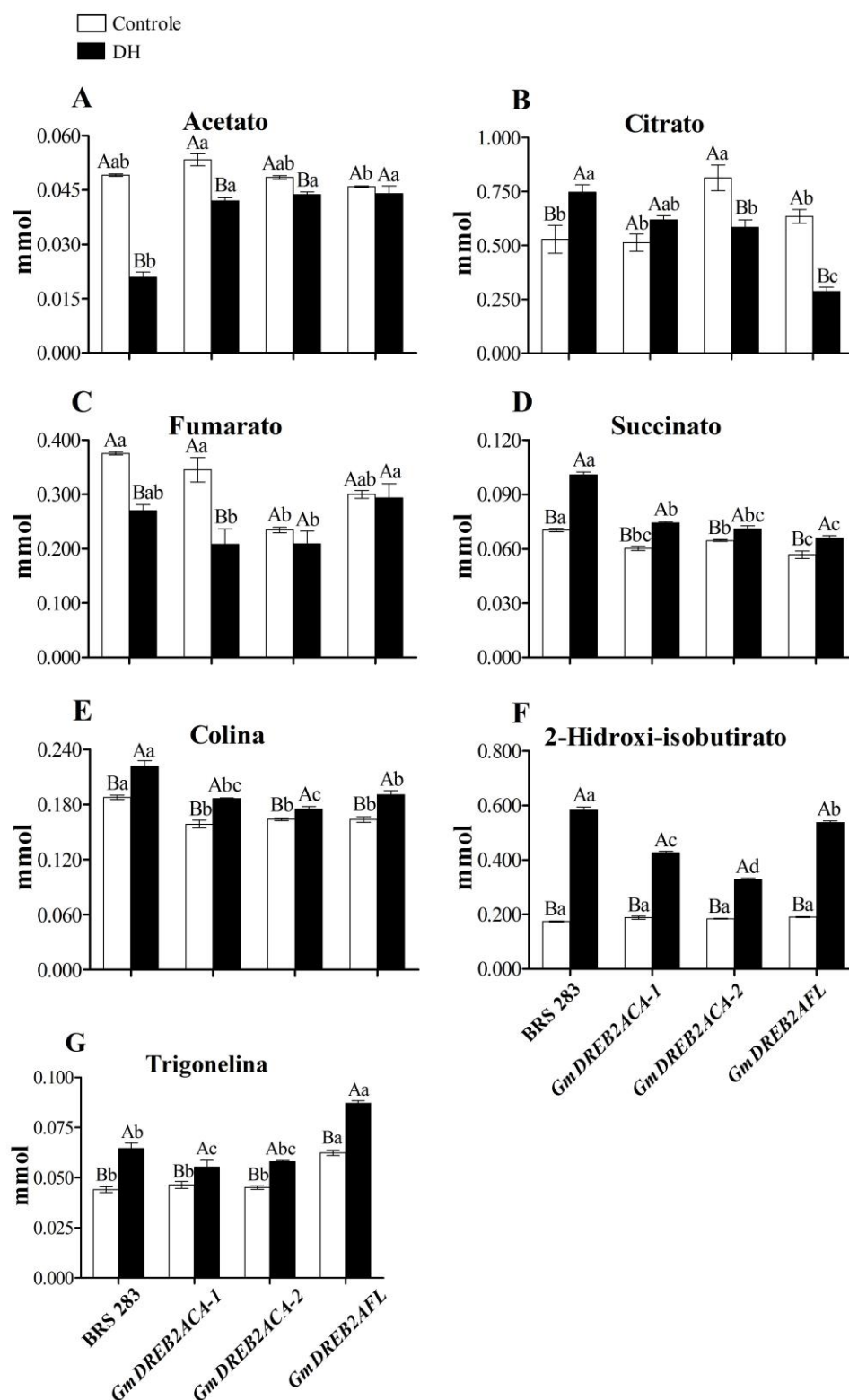


Figura 6 – Teor de ácidos orgânicos, colina e 2-hidroxi-isobutirato em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias ($n = 6$) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras

maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O evento GmDREB2ACA-2 mostrou maior conteúdo de citrato em folhas sob condição controle em relação à cultivar convencional BRS 283 e aos eventos GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL (Figura 5B). Após a imposição do déficit hídrico, a cultivar convencional BRS 283 apresentou conteúdo significativamente maior de citrato em relação à condição controle e aos eventos GmDREB2ACA-2 e GmDREB2AFL que, opostamente, reduziram significativamente os teores de citrato sob déficit hídrico (Figura 6B). O déficit hídrico também causou redução nos teores de fumarato nas folhas da cultivar BRS 283 e do evento GmDREB2ACA-1, além disso, sob tal condição hídrica o evento GmDREB2AFL apresentou maior teor desse ácido orgânico em relação aos dois eventos GmDREB2ACA e não diferiu estatisticamente da cultivar convencional BRS 283 (Figura 6C).

O teor do ácido orgânico succinato aumentou significativamente nas folhas de todos os genótipos sob déficit hídrico em relação à condição controle, e a cultivar convencional BRS 283 destacou-se com teores significativamente superiores aos dos genótipos GMs (Figura 6D). Para lactato e malonato não foi significativa a interação em folhas (Apêndice B), entretanto o efeito simples de condição hídrica indicou maiores teores desses compostos sob déficit hídrico em todos os genótipos em relação à condição controle (Tabela 1).

Os metabólitos colina (Figuras 6E) e 2-hidroxi-isobutirato (Figuras 6F) e trigonelina (Figura 6G) mostraram acúmulo sob restrição hídrica nas folhas de todos os genótipos. As folhas da cultivar convencional BRS 283 mostraram maior teor de colina em ambas as condições hídricas impostas (Figura 6E) e maior teor de 2-hidroxi-isobutirato na condição de déficit hídrico em relação aos eventos GMs (Figura 6F). Entretanto, para trigonelina o evento GmDREB2AFL apresentou teor significativamente maior comparado aos outros genótipos (Figura 6G).

Em raízes, interação significativa entre genótipo e condição hídrica foi observado para fumarato, lactato e 2-hidroxi-isobutirato (Apêndice C). Para fumarato as raízes das plantas de soja GMs e da cultivar convencional BRS 283 apresentaram redução acentuada após o déficit hídrico (Figura 7A). Em adição, sob situação controle, as raízes dos eventos GMs GmDREB2ACA-2 e GmDREB2AFL apresentaram teor maior de fumarato em relação ao evento GmDREB2ACA-1 (Figura 7A). Para lactato,

sob déficit hídrico, apenas as raízes da cultivar BRS 283 e do evento GmDREB2ACA-2 não apresentaram reduções nos teores em relação à situação controle (Figura 7B).

O efeito simples de condição hídrica afetou as quantidades dos ácidos orgânicos nas raízes das plantas de soja GMs e da cultivar convencional BRS 283, de modo que reduziu significativamente o acúmulo de acetato, malato, succinato, citrato, malonato nas raízes das plantas que passaram por restrição hídrica (Tabela 1). O efeito de genótipo encontrado para malonato mostrou que o evento GmDREB2ACA-1 diferiu estatisticamente do evento GmDREB2ACA-2, mas não diferiu do evento GmDREB2AFL e também da cultivar convencional BRS 283 (Tabela 2).

RAÍZES

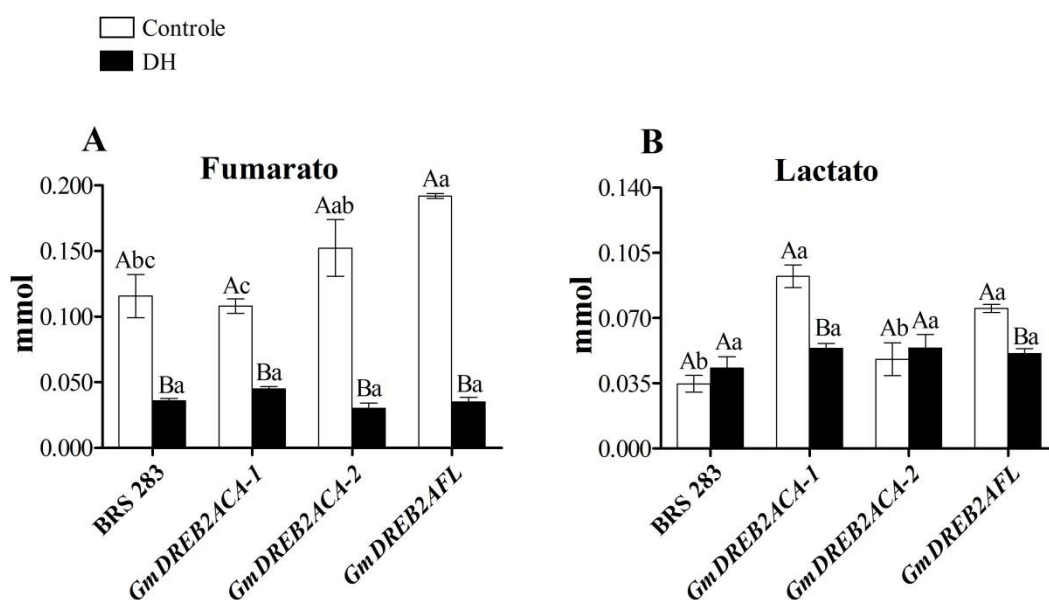


Figura 7 – Teor de ácidos orgânicos em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias (n = 6) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em raízes, houve redução significativa nas concentrações de colina (Tabela 1) e 2-hidroxi-isobutirato (Figura 8) em relação à condição controle para todos os genótipos. O evento GmDREB2ACA-2 quando em situação controle apresentou o menor teor de 2-hidroxi-isobutirato em relação a todos outros genótipos (Figura 8).

RAÍZES

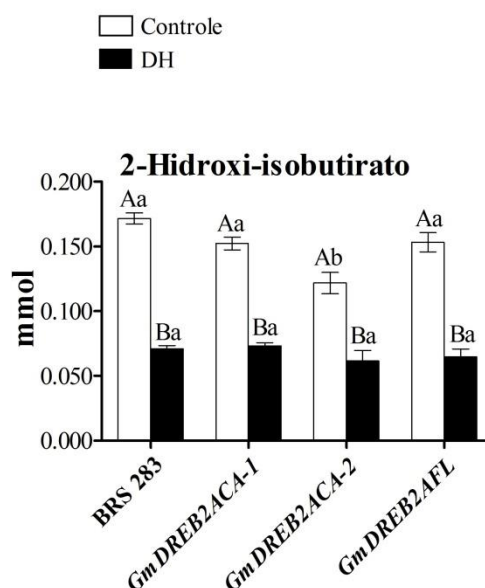


Figura 8 – Teor de 2-hidroxi-isobutirato em raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283) sob condições controle e déficit hídrico. As médias ($n = 6$) e erro padrão, representadas por colunas e barras, respectivamente, seguidas por letras maiúsculas semelhantes (entre condições hídricas) e letras minúsculas (entre genótipos) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3.4 Perfis metabólicos dos eventos GMs e da cultivar BRS 283 afetados pelo déficit hídrico

A figura 9 representa a informação sumarizada das principais vias metabólicas alteradas em folhas e raízes dos diferentes genótipos de soja sob déficit hídrico. Os resultados do estudo demonstraram que o déficit hídrico induziu alterações marcantes no metabolismo primário dos açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico. O efeito do estresse em relação ao acúmulo de metabólitos foi mais pronunciado nas folhas do que nas raízes, de modo que todos os genótipos em estudo apresentaram aumentos significativos para grande parte dos metabólitos identificados após a imposição do déficit hídrico (Figura 9). Em raízes, após déficit hídrico, as mudanças metabólicas que se destacaram para os genótipos em estudo foram redução significativa ou ausência de alterações no perfil de muitos metabólitos (Figura 9).

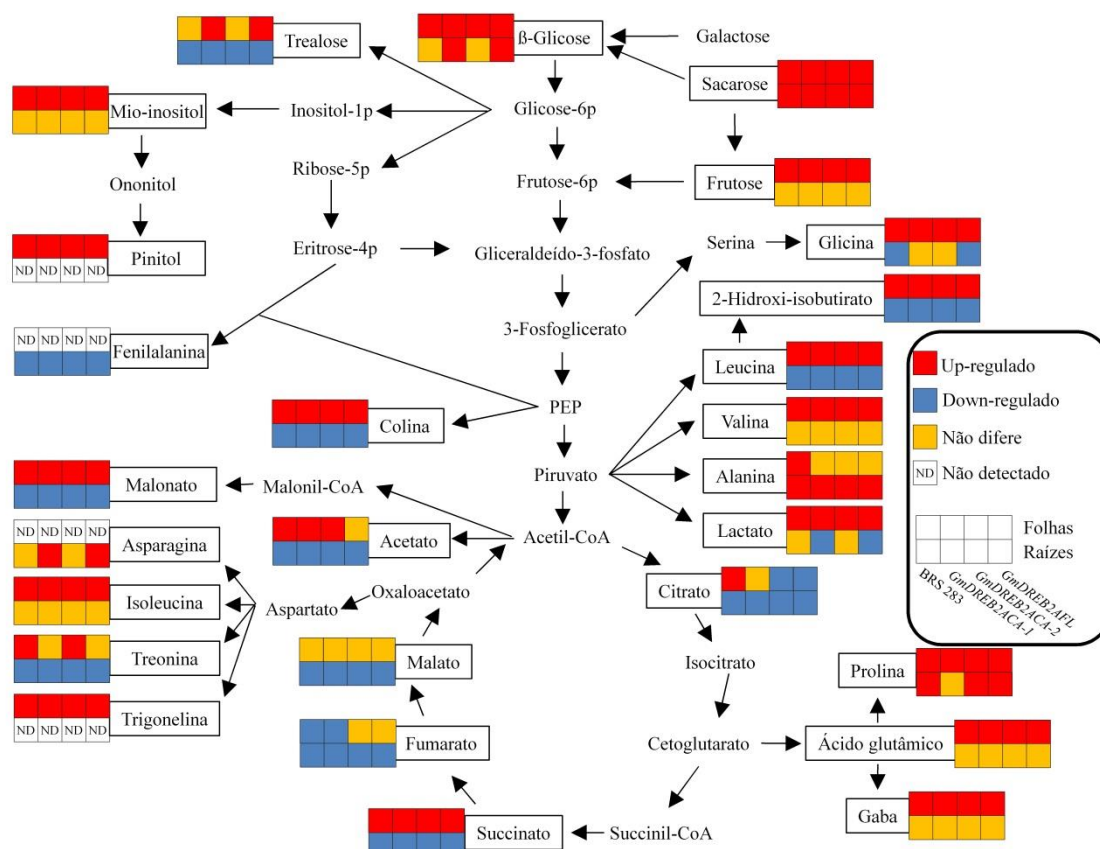


Figura 9 - Representação esquemática das vias metabólicas indicando as principais mudanças após a imposição do déficit hídrico (DH) em folhas e raízes dos genótipos geneticamente modificados (GmDREB2ACA e GmDREB2AFL) e da cultivar convencional (BRS 283). As caixas ao redor dos metabólitos indicam que foram detectados; os quadrados representam os genótipos, da esquerda para a direita BRS 283, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e GmDREB2AFL; a fileira de quadrados superior se refere às folhas e a inferior às raízes; a cor vermelha dos quadrados representa níveis significativamente maiores (*Up*-regulado) do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; a cor azul dos quadrados representa níveis significativamente menores (*Down*-regulado) do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; a cor amarela dos quadrados representa níveis semelhantes do metabólito na situação de déficit hídrico em relação ao controle irrigado; os quadrados brancos contendo a sigla ND (não detectado) indicam que o metabólito não foi detectado.

3.4 DISCUSSÃO

As análises de ^1H -RMN mostraram que o tratamento de déficit hídrico ocasionou mudanças consideráveis nos perfis metabólicos de folhas e raízes em diferentes intensidades. Os resultados encontrados em folhas revelaram teores mais elevados para a maioria dos metabólitos em todos os genótipos em situação de déficit hídrico, enquanto que nas raízes o estresse imposto levou principalmente à redução na concentração de muitos metabólitos. Similarmente, em plantas gramíneas C3, submetidas ao déficit hídrico, vários metabólitos foram acumulados opostamente em

partes aéreas e raízes, de maneira que quando o metabolismo é ativado em folhas é ao mesmo tempo desativado em raízes (GARGALLO-GARRIGA et al., 2014).

Das vias metabólicas afetadas pelo déficit hídrico, destacaram-se três grupos representados pelos carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. O metabolismo de carboidratos destacou-se pelo acúmulo de sacarose, β -glicose, frutose, mio-inositol e pinitol em folhas para todos os genótipos. Estudos anteriores mostraram que açúcares (como oligossacarídeos da família rafinose, sacarose, trealose e sorbitol), álcoois de açúcar, aminoácidos e aminas comumente se acumulam sob o estresse por seca (MOORE et al., 2009; TRIPATHI et al., 2016). O acúmulo de açúcares solúveis em tecidos de plantas com estresse de seca ou salinidade é responsável pela maior tolerância à baixa disponibilidade de água (GUPTA; KAUR, 2005; ROLLAND et al., 2006; WINGLER; ROITSCH, 2008) devido ao aumento na síntese de osmoprotetores ou solutos compatíveis que fazem parte do metabolismo normal (CHEN; MURATA, 2002). O acúmulo destes compostos ajuda as células estressadas na retenção de água (HARE et al., 1998) e na manutenção da integridade estrutural das membranas celulares (CONROY et al., 1988).

Uma diferença marcante entre os genótipos testados foi quanto ao acúmulo de sacarose sob déficit hídrico. Embora todos os genótipos tenham acumulado sacarose sob estresse, a cultivar convencional BRS 283 se destacou em comparação aos genótipos GMs por apresentar um aumento acentuado desse açúcar sob déficit hídrico. Uma possível explicação para esse resultado é a redução no crescimento de plantas sob déficit hídrico, o que levaria ao menor consumo desse açúcar para a formação de novos tecidos. A redução do crescimento, principalmente da parte aérea, é uma resposta comumente observada em situações de déficit hídrico (CHEN et al., 2014; SKIRYCYZ; INZÉ, 2010), inclusive em estudos prévios do nosso grupo utilizando esses mesmos genótipos. Dessa forma, esses processos seriam mais drasticamente afetados na cultivar sensível em comparação aos eventos GM.

Neste trabalho, após a seca induzida, os teores de β -glicose e frutose foram significativamente maiores em folhas e raízes dos eventos GmDREB2AFL GmDREB2ACA-1 em relação à cultivar convencional BRS 283, diferentemente dos teores de sacarose que foram maiores na cultivar BRS 283 em relação aos genótipos GMs. Em plantas, a sacarose pode ser convertida em frutose e glicose pela ação de duas enzimas catalizadoras, a invertase e a sacarose sintase (WINTER; HUBER, 2000). O

menor acúmulo de glicose e frutose em alguns genótipos pode ser decorrente da menor atividade dessas enzimas. Visto que González et al. (1995) e Andersen et al. (2002) observaram, respectivamente, a redução de atividade das enzimas sacarose sintase em nódulos de soja e invertases em plantas de milho após déficit hídrico.

Além disso, a cultivar BRS 283 apresentou maior acúmulo de sacarose em folhas o que explica as menores concentrações de glicose e frutose observadas nesse genótipo, o que também foi elucidado por González et al. (1995) quando detectou menor atividade sacarose sintase associada ao aumento de sacarose em milho após déficit hídrico. Cabe destacar aqui, que em trabalhos prévios que avaliaram as respostas fisiológicas desses eventos GM nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura, a cultivar BRS 283 e o evento GmDREB2ACA-2, genótipos com maiores acúmulos de sacarose, foram os que apresentaram menor tolerância à seca. Assim, esse padrão de acúmulo observado pode estar associado ao nível de tolerância desses genótipos.

Sob déficit hídrico, o perfil de acúmulo encontrado para a trealose nas folhas dos eventos GMs GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL também mostrou-se maior em relação ao evento GM GmDREB2ACA-2 e na cultivar BRS 283. Níveis elevados de trealose também foram observados em *Capparis ovata* e contribuíram para alta tolerância ao estresse por seca (ILHAN et al., 2014). Vários trabalhos relataram que plantas expressando o transgene trealose-6-fostato sintase (TPS) apresentaram elevadas taxas de trealose 6-fosfato, auxiliando na percepção do déficit de carbono e regulação da fotossíntese (LYU et al., 2013; PELLNY et al., 2004; RATHOD et al., 2016).

Todos os genótipos de soja deste estudo, quando expostos à seca, mostraram aumento no conteúdo de sacarose nas raízes, em oposição menor teor de trealose foi detectado em relação à condição controle. Apesar da redução no conteúdo de trealose após a imposição do déficit hídrico, a planta GM GmDREB2AFL apresentou conteúdo de trealose significativamente maior que a planta BRS 283. Embora as vias biossintéticas de trealose e sacarose tenham características comuns, ao mesmo tempo possuem regulações distintas, não só a biossíntese, mas também as propriedades moleculares da trealose diferem em comparação à sacarose (GODDIJN; VAN DUN, 1999). A trealose tem a temperatura de transição vítrea mais alta, mantendo sua estrutura sob temperaturas extremas, condições de restrição hídrica e também de estresse por baixa temperatura, o que aumenta a estabilidade destas biomoléculas (RICHARDS; DEXTER, 2002). Em adição, na maioria das espécies vegetais os níveis

de trealose são muito baixos para ter uma função como osmoprotetores, sendo esta função assumida principalmente pela sacarose (SALERNO; CURATTI, 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram acúmulo de mio-inositol e pinitol sob condição de déficit hídrico nas folhas de todos os genótipos. Em plantas de tabaco, a presença de mio-inositol proporcionou proteção de enzimas sensíveis e de membranas danificadas por espécies reativas de oxigênio (EROs) após estresse salino. No entanto, esse aumento de mio-inositol ocasionou atraso no crescimento dessas plantas (SHEVELEVA et al., 1997). O que pode correlacionar o maior acúmulo de mio-inositol nas folhas das plantas GmDREB2ACA-1 deste estudo com dados de crescimento inferior de plantas GmDREB2ACA-1 em relação aos demais genótipos (dados não publicados). Em relação ao pinitol, as folhas da cultivar convencional BRS 283 apresentaram conteúdo superior em comparação aos genótipos GMs. De acordo com Silvente (2012), sob condição de seca os maiores níveis de pinitol foram encontrados nas folhas de uma cultivar de soja sensível, enquanto que foram menores na cultivar tolerante à seca.

Os aminoácidos são componentes essenciais de proteínas e os principais metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio (N) das plantas (OHYAMA et al., 2017). As plantas de soja de todos os genótipos submetidos ao estresse hídrico no presente estudo apresentaram aumento nas concentrações dos aminoácidos glicina, leucina, valina, prolina, ácido glutâmico, gaba e isoleucina em folhas e de alanina em raízes. De modo semelhante, Witt et al. (2012) encontraram altas concentrações de alguns aminoácidos como prolina, triptofano, fenilalanina e histidina, em híbridos de milho submetidos ao estresse por seca. Muscolo et al. (2015) também detectaram aumento nos níveis de vários aminoácidos, tais como metionina, isoleucina, valina, arginina, prolina, histidina, fenilalanina, tirosina, ornitina e asparagina, em genótipos de lentilha submetidos ao estresse osmótico induzido por polietileno glicol (PEG).

O aumento no conteúdo de aminoácidos está relacionado ao aumento de tolerância ao estresse nas plantas (SANCHEZ et al., 2008), que ocorre por meio do ajuste osmótico e regulação intracelular do pH (ALIA et al., 2001; DE RONDE et al., 2000). Estudos apontam que situações adversas como o estresse osmótico desencadeia o processo de autofagia que envolve a remobilização de nutrientes das folhas para suprir necessidades fisiológicas das plantas (MARSHALL; VIERSTRE, 2018), como por exemplo, a degradação de proteínas para obtenção de energia em uma via respiratória

alternativa, levando ao acúmulo de aminoácidos (ISHIZAKI et al., 2005; IZUMI et al., 2013). Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a cultivar BRS 283 tenha apresentado intensificação na degradação de proteínas para obtenção de energia em uma via respiratória alternativa, visto que apresentou maior acúmulo da maioria dos aminoácidos em folhas em comparação aos genótipos GMs.

Em soja, a asparagina é uma das principais formas de nitrogênio solúvel sintetizado na folha e transportado para a raiz através do floema (OHYAMA et al., 2017), sendo essencial para desenvolvimento das plantas, uma vez que o nitrogênio é necessário, sobretudo, para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas, hormônios, clorofila e vários outros compostos (SILVEIRA; MONTEIRO, 2007). Em situação de restrição hídrica, Ramos et al. (2005) detectaram maiores quantidades de asparagina em nódulos de plantas de soja comparadas às plantas irrigadas. Da mesma forma, o presente estudo observou maiores níveis de asparagina em raízes das plantas GMs GmDREB2ACA-1 e GmDREB2AFL submetidas à seca em relação à cultivar BRS 283 e às plantas GmDREB2ACA-1.

Os ácidos orgânicos têm múltiplas funções nas plantas, incluindo regulação do pH e potencial osmótico, defesa contra patógenos, metabolismo energético (ciclo dos ácidos tricarboxílicos - TCA) e antioxidante em resposta a diferentes estresses ambientais (JONES, 1998; MA et al., 2001), como por exemplo na resposta bioquímica à seca (AGUIAR et al., 2016; CATOLA et al., 2016; FANG; XIONG, 2015).

Estudos com genótipos de soja mostraram que as folhas plantas expostas à seca apresentaram maiores teores dos ácidos orgânicos succinato, malato e ácido 2-oxoglutarico (SILVENTE et al., 2012). Semelhantemente, o presente trabalho encontrou aumento dos ácidos orgânicos succinato, malonato e lactato nas folhas de todos os genótipos, como efeito do déficit hídrico induzido experimentalmente. O acúmulo de metabólitos como os ácidos orgânicos pode servir como estratégia para o suprimento de energia na via alternativa dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (ZANDALINAS et al., 2017).

Por outro lado, nas raízes das plantas de soja submetidas ao déficit hídrico houve diminuição dos ácidos orgânicos fumarato, citrato, succinato, malato e acetato de todos os genótipos deste experimento. Corroborando com a diminuição nas quantidades de ácidos orgânicos que foi observada em raízes de lentilhas sob estresse osmótico (MUSCOLO et al., 2015).

O aumento nos conteúdos de outros metabólitos como colina e trigonelina foi detectado sob déficit hídrico para todos os genótipos deste experimento. O conteúdo superior observado para colina em plantas BRS 283 e para trigonelina em plantas GmDREB2AFL pode estar relacionado à atuação destes compostos como osmoprotetores, assim como constatado por altos níveis de colina em plantas de *Arabidopsis* (ZHANG et al., 2010) e trigonelina em plantas de soja (MALENCIC et al., 2003) tendo função osmoprotetora em resposta ao estresse osmótico por desidratação.

Dentre as vias metabólicas afetadas pelo déficit hídrico nos genótipos deste estudo, o metabolismo de carboidratos e de aminoácidos destacou-se pelo acúmulo de muitos metabólitos em relação ao acúmulo de intermediários do ciclo TCA. Os resultados evidentes da presença de altas concentrações detectadas nas folhas para a maioria dos metabólitos sugerem que esta foi uma estratégia metabólica precisa de defesa usada por todos os genótipos em condição de estresse. Diferentes concentrações de muitos metabólitos analisados também foram observadas entre os eventos GM e a cultivar convencional BRS 283, indicando que os fatores de transcrição inseridos geraram alterações no metabolismo destas plantas.

Os dados de folhas indicaram que sob déficit hídrico os eventos GmDREB2AFL e GmDREB2ACA-1 tiveram superioridade na concentração de metabólitos envolvidos no metabolismo de carboidratos como frutose, β -glicose, trealose e mio-inositol em relação à cultivar convencional BRS 283. De maneira oposta, o metabolismo de resposta priorizado pelas folhas da cultivar convencional BRS 283 foi o de aminoácidos. Em raízes, além do maior acúmulo do carboidrato β -glicose para os eventos GmDREB2AFL e GmDREB2ACA-1 em relação à BRS 283, após a imposição do déficit hídrico, o maior conteúdo de asparagina, presente no evento GmDREB2AFL, e fenilalanina presente no evento GmDREB2ACA-1, também podem ter atuado como osmoprotetores acentuando e melhorando as respostas destas plantas ao estresse imposto.

Portanto, o presente estudo mostrou a alteração em larga escala do metabolismo nas plantas de soja expostas experimentalmente à seca, revelando respostas genotípicas específicas em relação aos acúmulos de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros compostos. A variação no perfil metabólico detectada entre os genótipos pode explicar em parte o melhor desempenho das plantas de soja GMs com GmDREB2ACA-

1 e GmDREB2AFL, corroborando com estudos prévios sobre a maior tolerância desses eventos em situação de seca. A identificação de genótipos responsáveis pelos principais mecanismos metabólicos de tolerância ao estresse hídrico em plantas de soja pode ajudar a formular estratégias para a melhoria na produtividade.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P.K.; AGARWAL, P.; REDDY, M.K.; SOPORY, S.K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reporter**, v.25, p.1263–1274, 2006.
- AGUIAR, N.O.; MEDICI, L.O.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S.F.; NOVOTNY, E.H.; CANELLAS, L.P. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology*, v.168, p.203–213, 2016.
- ANDERSEN, M.N.; ASCH, F.; WU, Y.; JENSEN, C.R.; NAESTED, H.; MOGENSEN, V.O.; KOCH, K.E. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. **Plant Physiology**, v.30, p.591-604, 2002.
- BLIGNY, R., DOUCE, R. NMR and plant metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.191–196, 2001.
- CASARETTO, J.A.; EL-KEREAMY, A.; ZENG, B.; STIEGELMEYER, S.M.; CHEN, X.; BI, Y.-M.; ROTHSTEIN, S.J. Expression of *OsMYB55* in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. **BMC Genomics**, v.17, p.1–15, 2016.
- CATOLA, E.; MARINO, G.; EMILIANI, G.; HUSEYNOVA, T.; MUSAYEV, M.; AKPAROV, Z.; MASERTI, B.E. Physiological and metabolomic analysis of *Punica granatum* (L.) under drought stress. **Planta**, v.243, p.441-449, 2016.
- CHARLTON, A.J.; DONARSKI, J.A.; HARRISON, M.; JONES, S.A.; GODWARD, J.; OEHLISCHLAGER, S.; ARQUES, J.L.; AMBROSE, M.; CHINOY, C.; MULLINEAUX, P.M.; DOMONEY, C. Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Metabolomics**, v.4, p.312–327, 2008.
- CHEBROLU, K.K.; FRITSCHI, F.B.; YE, S.; KRISHNAN, H.B.; SMITH, J.R.; GILLMAN, J.D. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. **Metabolomics**, v.12, p.28, 2016.
- CHEN, T.H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.250–257, 2002.

CHEN, X.; CHEN, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; CHENG, B.; XIANG, Y. Genome-wide analysis of soybean hd-zip gene family and expression profiling under salinity and drought treatments. **PLoS ONE**, v.9, n.2, p.1-17, 2014.

CLARKE, J.D.; ALEXANDER, D.C.; WARD, D.P.; RYALS, J.A.; MITCHELL, M.W.; WULFF, J.E.; GUO, L. Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. **Scientific Reports**, v.3, 3082, 2013.

CONROY, M.J.; GOLDSBERRY, J.R.; HINES, J.E.; STOTTS, D.B. Evaluation of aerial transects surveys for wintering American black ducks. **Journal of Wildlife Management**, v.52, p.694–703, 1988.

CVIKROVÁ, M.; GEMPERLOVÁ, L.; MARTINCOVÁ, O.; VANKOVÁ, R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.73, p.7–15, 2013.

DANQUAH, A.; DE ZELICOURT, A.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. **Biotechnology Advances**, v.32, p. 40–52, 2014.

DAS, A.; RUSHTON, P.J.; ROHILA, J.S. Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine Max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. **Plants**, v.6, p.1-26, 2017.

DE RONDE, J.A.; VAN DER MESCHT, A.; STEYN, H.S.F. Proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. **African Crop Science Journal**, v.8, p.85-91, 2000.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, p.673-689, 2015.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. **Ames, Yowa: Yowa State University of Science and Technology**, Cooperative Extension Service, n.80, p.11, 1977.

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

GARGALLO-GARRIGA, A.; SARDANS, J.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; RIVAS-UBACH, A.; ORAVEC, M.; VECEROVA, K.; URBAN, O.; JENTSCH, A.; KREYLING, J.; BEIERKUHNLEIN, C.; PARELLA, T.; PENUELAS, J. Opposite metabolic responses of shoots and roots to drought. **Scientific Reports**, v.4, p.1-7, 2014.

GILROY, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; CHOI, W-G.; TOYOTA, M.; DEVIREDDY, A.R.; MITTLER, R. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends Plant Science**, v.19, p. 623–630, 2014.

GODDIJN, O.J.M.; VAN DUN, K. Trehalose metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.315-319, 1999.

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

GUPTA, A.K.; KAUR, N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of Biosciences**, v.30, p.761-776, 2005.

GUY, C.; KAPLAN, F.; KOPKA, J.; SELBIG, J.; HINCHA, K.K. Metabolomics of temperature stress. **Physiologia Plantarum**, v.132, p. 220-235, 2008.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN, STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environmental**, v.21, p. 535–553, 1998.

HUANG, B.; GAO, H. Growth and carbohydrate metabolism of creeping bentgrass cultivars in response to increasing temperatures. **Crop Science**, v.40, p.1115–1120, 2000.

ILHAN, S.; OZDEMIR, F.; BOR, M. Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf. **Plant Biology**. v.17, p.402-407, 2015.

ISHIZAKI, K.; LARSON, T.R.; SCHAUER, N.; FERNIE, A.R.; GRAHAM, I.A.; LEAVER, C.J. 2005. The critical role of Arabidopsis ELECTRON-TRANSFER FLAVOPROTEIN:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE during dark-induced starvation. **Plant Cell**, v. 17, p. 2587-600, 2005.

IZUMI, M.; HIDEMA, J.; MAKINO, A.; ISHIDA, H. Autophagy contributes to night-time energy availability for growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 161, p.1682–1693, 2013.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. **Plant and Soil**, v.205, n.25-44, 1998.

JORGE, T.F.; RODRIGUES, J.A.; CALDANA, C.; SCHMIDT, R.; DONGEN, J.T.V.; THOMAS-OATES, J.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Analytical Science Journals*, v.35, p.620-649, 2015.

LI, L.; HUR, M.; LEE, J.Y.; ZHOU, W.; SONG, Z.; RANSOM, N.; DEMIRKALE, C.Y.; NETTLETON, D.; WESTGATE, M.; ARENDSEE, Z.; et al. A systems biology approach toward understanding seed composition in soybean. **BMC Genomics**, v. 16, S9, 2015.

LYU, J.I.; MIN, S.R.; LEE, J.H.; LIM, Y.H.; KIM, J.K.; BAE, C.H.; LIU, J.R. Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.112, p.257-262, 2013.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273-278, 2001.

MALENCIC, D.; POPOVIC, M.; MILADINOVIC, J. Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. **Biologia Plantarum**, v.46, p.141-143, 2003.

MARSHALL, R.S.; VIERSTRA, R.D. Autophagy: the master of bulk and selective recycling. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 69, p. 22.1-22.36, 2018.

MIZOI, J.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; KIDOKORO, S.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; KUSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *GmDREB2A;2*, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is post translational regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. **Plant Physiology**, v.161, p.346-361, 2013.

MOORE, J.P.; LE, N.T.; BRANDT, W.F.; DRIOUICH, A.; FARRANT, J.M. Towards a systems based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.14, p.110-7, 2009.

MUSCOLO, A.; JUNKER, A.; KLUKAS, C.; WEIGELT-FISCHER, K.; RIEWE, D.; ALTMANN, T. Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.5467-5480, 2015.

OHYAMA, T.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; ONO, Y.; TSUTSUMI, K.; UENO, M.; TAKAHASHI, Y. Amino acid metabolism and transport in soybean plants. **Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal**, 2017.

PELLNY, T.K.; GHANNOUM, O.; CONROY, J.P.; SCHLUEPMANN, H.; SMEEKENS, S.; ANDRALOJC, J.; KRAUSE, K.P.; GODDIJN, O.; PAUL, M.J. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. **Plant Biotechnology Journal**, v.2, 71-82, 2004.

RABARA, R.C.; TRIPATHI, P.; RUSHTON, P.J. Comparative metabolome profile between tobacco and soybean grown under water-stressed conditions. **BioMed Research International**, v.2017, n.3065251, 2017.

RAMOS, M.L.G.R.; PARSONS, R.; SPRENT, J.I. Differences in ureide and amino acid content of water stressed soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. **Plant Physiology**, v.40, n.453-458, 2005.

RATHOD, J. P., PRAKASH, G., VIRA, C., AND LALI, A. M. Trehalose phosphate synthase overexpression in *Parachlorella kessleri* improves growth and photosynthetic performance under high light conditions. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.46, p.803-809, 2016.

RICHARDS, A.B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L.B.; SCHMID, H.; WOLTERBEEK, A.P.M.; WAALKENS-BERENDSEN, D.H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.871-898, 2002.

- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms, **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.675–709, 2006.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. **Plant Cell**, v.18, p.1292-1309, 2006.
- SALERNO, G.; CURATTI, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? **Trends in Plant Science**, v.8, p.63-69, 2003.
- SANCHEZ, D.H.; LIPPOLD, F.; REDESTIG, H.; HANNAH, M.A.; ERBAN, A.; KRAMER, U.; KOPKA, J.; UDVARDI, M.K. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. **Plant Journal**, v.53, p.973–987, 2008.
- SHEVELEVA, E.; CHMARA, W.; BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, v.115, p. 1211-1219, 1997.
- SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v.132, p.199–208, 2008.
- SILVEIRA, C.P.; MONTEIRO, F.A. Morfogênese e produção de biomassa do capim-tanzânia adubado com nitrogênio e cálcio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 335- 342, 2007.
- SILVENTE, S.; SOBOLEV, A.P.; LARA, M. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS ONE**, v. 7, e38554, 2012.
- SKIRY CZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p.197-203, 2010.
- TRIPATHI, P.; RABARA, R.C.; REESE, R.N.; MILLER, M.A.; ROHILA, J.S.; SUBRAMANIAN, S.; SHEN, Q.J.; MORANDI, D.; BUCKING, H.; SHULAEV, V.; RUSHTON, P.J. A toolbox of genes, proteins, metabolites and promoters for improving drought tolerance in soybean includes the metabolite coumestrol and stomatal development genes. **BMC Genomics**, v.17, p.1-22, 2016.
- USDA, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, March 2018. World agricultural supply and demand estimates. Online Database (<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/wasde/wasde-03-08-2018.pdf>).
- WINGLER, A.; ROITSCH, T. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signaling with biotic and abiotic stress responses. **Plant Biology**, v.10, p.50-62, 2008.

WINTER, H; HUBER, SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of keys enzymes. **Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 253-289, 2000.

WITT, S.; GALICIA, L.; LISEC, J.; CAIRNS, J.; TIESSEN, A.; ARAUS, J.L.; PALACIOS-ROJAS, N.; FERNIE, A.R. Metabolic and phenotypic responses of greenhouse-grown maize hybrids to experimentally controlled drought stress. **Molecular Plant**, v.5, p.401-417, 2012.

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

ZANDALINAS, S.I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v.162, p-2-12, 2018.

ZANDALINAS, S.I.; SALES, C.; BELTRÁN, J.; GÓMES-CANDENAS, A.; ARBONA, V. Activation of secondary metabolism in Citrus plants is associated to sensibility to combined drought and high temperatures. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-17, 2017.

ZHANG, H.; MURZELLO, C.; SUN, Y.; KIM, M-S.; XIE, X.; JETER, R.M.; ZAK, J.C.; DOWD, S.E.; PARÉ, P.W. Choline and osmotic-stress tolerance induced in Arabidopsis by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.23, p.1097-1104, 2010.

3.6 MATERIAL COMPLEMENTAR

Apêndice A - Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento dos metabólitos primários identificados no extrato hidroalcoólico das folhas e raízes de soja.

METABÓLITOS	Deslocamento químico (δ,ppm) e constante de acoplamento (J, Hz)
CARBOIDRATOS	
β-Glicose	5.21 (3.7), 4,62 (8.0)
Frutose	
Mio-inositol	3.62 (t, 4.2)
Pinitol	3.60 (s)
Sacarose	5.40 (3.8)
Trealose	5.17 (d, 1.7)
AMINOÁCIDOS	
Ácido glutâmico	2,12 (m)
Alanina	1,46 (7.3)
Glicina	3,55 (s)
Gaba	1,88 (m), 2,29 (t, 7.4), 3.01 (t, 3.4)
Isoleucina	0,93 (t, 7.6), 0,98 (d, 7.5)
Leucina	0,95 (t, 6.7)
Prolina	2,03 (m), 2.34 (m)
Treonina	1,32 (6.6)
Valina	0,98 (6.90)
ÁCIDOS ORGÂNICOS	
Acetato	1.91 (s)
Citrato	2.53 (d, 16.1)
Fumarato	6.50 (s)
Lactato	1,32 (d,6.3)
Malato	2.34 (dd, 10.1), 2.65 (2.9)
Malonato	3.10 (s)
Succinato	2.38 (s)
OUTROS	
Colina	3.2 (s)
2-Hidroxi-isobutirato	1,36 (s)
Trigonelina	8,85 (t, 6,3)

Apêndice B – Resumo da análise de variância dos compostos metabólicos encontrados por $^1\text{H-RMN}$ nas folhas dos eventos geneticamente modificados (GMs) da soja GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e da cultivar convencional BRS 283 sob as condições controle (C) e déficit hídrico (DH).

METABÓLITOS	QUADRADO MÉDIO						
	Blocos	G	CH	GxCH	Resíduo	CV (%)	Média
GL	2	3	1	3	14		
CARBOIDRATOS							
β-Glicose	0,014	0,514*	21,109*	0,480*	0,006	4,63	1,646
Frutose	0,014	0,292*	14,902*	0,643*	0,007	5,02	1,671
Mio-inositol	0,005	0,199*	2,247*	0,217*	0,002	5,58	0,855
Pinitol	0,012	0,262*	6,700*	0,437*	0,009	4,49	2,085
Sacarose	0,004	2,817*	9,730*	2,615*	0,002	3,96	1,096
Trealose	0,000	0,001*	0,003*	0,002*	0,000	20,71	0,068
AMINIOÁCIDOS							
Ácido glutâmico	0,010	0,015	0,048*	0,008	0,007	32,39	0,262
Alanina	0,000	0,000*	0,000*	0,000*	0,000	13,44	0,047
Gaba	0,001	0,007*	0,122*	0,006*	0,001	19,47	0,132
Glicina	0,000	0,089*	1,781*	0,057*	0,001	5,83	0,543
Isoleucina	0,000	0,003*	0,027*	0,004*	0,000	12,5	0,042
Leucina	0,000	0,001*	0,034*	0,001*	0,000	9,53	0,062
Prolina	0,002	0,365*	1,304*	0,377*	0,001	13,79	0,267
Treonina	0,000	0,000*	0,003*	0,001*	0,000	30,95	0,025
Valina	0,000	0,005*	0,046*	0,005*	0,000	13,86	0,055
ÁCIDOS ORGÂNICOS							
Acetato	0,000	0,000*	0,001*	0,000*	0,000	4,85	0,043
Citrato	0,014	0,063*	0,024*	0,109*	0,004	10,42	0,572
Fumarato	0,000	0,011*	0,028*	0,006*	0,001	11,76	0,280
Lactato	0,000	0,000	0,002*	0,000	0,000	30,45	0,027
Malato	0,008	0,244*	0,000	0,184*	0,001	3,68	1,974
Malonato	0,019	0,038	0,154*	0,002	0,019	92,03	0,150
Succinato	0,000	0,001*	0,001*	0,000*	0,000	3,03	0,070
OUTROS							
2-Hidroxi-isobutirato	0,000	0,019*	0,486*	0,021*	0,000	2,9	0,327
Colina	0,000	0,001*	0,004*	0,000*	0,000	3,32	0,181
Trigonelina	0,000	0,001*	0,002*	0,000*	0,000	5,68	0,058

G=genótipos; CH= condição hídrica; CV=coeficiente de variação; GL= grau de liberdade; Gaba=ácido gama-aminobutírico. * Significativo de acordo com teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Apêndice C – Resumo da análise de variância dos compostos metabólicos encontrados por ¹H-RMN nas raízes dos eventos geneticamente modificados da (GMs) soja GmDREB2AFL, GmDREB2ACA-1, GmDREB2ACA-2 e da cultivar convencional BRS 283 sob as condições controle (C) e déficit hídrico (DH).

Metabólitos	Quadrado médio						Média
	Blocos	G	CH	GxCH	Resíduo	CV (%)	
GL	2	3	1	3	14		
CARBOIDRATOS							
β-Glicose	0,034	0,213*	0,243*	0,098*	0,020	15,08	0,939
Frutose	0,006	0,419*	0,036	0,050	0,054	17,94	1,291
Mio-inositol	0,008	0,028	0,029	0,007	0,010	21,48	0,478
Sacarose	0,130	0,006	30,583*	0,248	0,103	16,65	1,927
Trealose	0,000	0,001*	0,072*	0,000*	0,000	12,15	0,096
AMINIOÁCIDOS							
Ácido glutâmico	0,001	0,000	0,002	0,001	0,001	27,01	0,119
Alanina	0,000	0,000	0,000*	0,000	0,000	10,67	0,028
Asparagina	0,001	0,004*	0,007*	0,001*	0,000	12,05	0,136
Gaba	0,000	0,004*	0,000	0,006*	0,000	14,39	0,088
Glicina	0,006	0,014	0,097*	0,017*	0,005	24,12	0,291
Isoleucina	0,000	0,000*	0,000	0,000	0,000	15,7	0,025
Leucina	0,000	0,000	0,001*	0,000	0,000	15,2	0,044
Prolina	0,001	0,001	0,105*	0,012*	0,001	26,41	0,125
Treonina	0,000	0,000	0,002*	0,000	0,000	30,88	0,049
Valina	0,000	0,000*	0,000	0,000	0,000	17,43	0,027
ÁCIDOS ORGÂNICOS							
Acetato	0,000	0,000	0,030*	0,001*	0,000	8,03	0,173
Citrato	0,039	0,018	1,082*	0,014	0,033	46,05	0,394
Fumarato	0,000	0,002*	0,067*	0,003*	0,000	18,93	0,089
Lactato	0,000	0,001*	0,001*	0,001*	0,000	16,38	0,057
Malato	0,886	0,613	14,186*	0,249	0,684	22,31	3,706
Malonato	0,195	0,838*	1,693*	0,235	0,191	65,02	0,672
Succinato	0,000	0,001	0,169*	0,000	0,000	9,53	0,167
OUTROS							
2-Hidroxi-isobutirato	0,000	0,001*	0,040*	0,000*	0,000	8,95	0,109
Colina	0,000	0,000	0,067*	0,001	0,000	7,55	0,230
Fenilalanina	0,000	0,000*	0,001*	0,000	0,000	24,06	0,023

G=genótipos; CH= condição hídrica; CV=coeficiente de variação; GL= grau de liberdade; Gaba=ácido gama-aminobutírico. * Significativo de acordo com teste Tukey ($p \leq 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho realizou-se uma caracterização detalhada das respostas de plantas de soja GMs com o gene *GmDREB2A* nas diferentes fases de desenvolvimento (germinação, período vegetativo e reprodutivo). Muitos estudos com homólogos DREB2A têm sido realizados em diversas culturas com a finalidade de elucidar os mecanismos de resposta desencadeados por este fator de transcrição. Todavia, até o presente momento desconheciam-se as respostas de plantas de soja GMs com *DREB2A* em diferentes períodos do desenvolvimento da cultura.

Os resultados das caracterizações moleculares, metabólicas, fisiológicas e agronômicas demonstraram que os eventos *GmDREB2AFL* e *GmDREB2ACA-1* apresentaram importantes respostas sob déficit hídrico nas diferentes fases de desenvolvimento, indicando efetiva regulação desses fatores de transcrição nos eventos gerados.

As plantas GMs apresentaram uma mudança significativa na expressão de genes estresse induzidos, bem como, no acúmulo de importantes metabólitos, o que contribuiu para a maior tolerância da plantas permitindo a manutenção do turgor e do metabolismo primário essencial, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica.

Apesar dos indícios do potencial desses genótipos em conferir maior estabilidade de rendimento à cultura sob déficit hídrico em casa de vegetação, trabalhos posteriores em condições de campo, poderão permitir uma melhor caracterização dos genótipos quanto à produtividade sob condições limitantes de água.