

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES, IDENTIFICAÇÃO,
SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE SNPs EM GENES ENVOLVIDOS NA
TOLERÂNCIA DA SOJA AO EXCESSO HÍDRICO

Cecilia Paz da Silva Giordano
Engenheira Agrônoma/UFRGS
Mestre em Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutora em Fitotecnia
Área de concentração: Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Julho, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Giordano, Cecilia Paz da Silva
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES,
IDENTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE SNPs EM GENES
ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA DA SOJA AO EXCESSO HÍDRICO /
Cecilia Paz da Silva Giordano. -- 2018.
120 f.
Orientador: Christian Bredemeier.

Coorientadora: Maria Helena Bodanese Zanettini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2018.

1. Soja. 2. Alagamento. 3. tolerância. 4. SNP. 5.
Excesso hídrico. I. Bredemeier, Christian, orient.
II. Zanettini, Maria Helena Bodanese, coorient. III.
Título.

CECILIA PAZ DA SILVA GIORDANO
Engenheira Agrônoma - UFRGS
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTORA EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.07.2018
Pela Banca Examinadora

CHRISTIAN BREDEMEIER
Orientador
UFRGS

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

MARIA HELENA BODANESE
ZANETTINI
Coorientadora
UFRGS

SAMUEL CORDEIRO VITOR MARTINS
UFV

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

CLAUDIA ERNA LANGE
ORYZA & SOY

JOSÉ FERNANDES BARBOSA NETO
UFRGS

Dedico

À minha família.

“Hay hombres que de su ciencia
Tienen la cabeza llena;
Hay sabios de todas menas,
Mas digo, sin ser muy ducho:
Es mejor que aprender mucho
El aprender cosas buenas.”

José Hernández

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS), em especial ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Fitotecnia, pela oportunidade e estrutura oferecidas.

Ao Professor Christian Bredemeier pela orientação, motivação, ensinamentos compartilhados e pelo exemplo pessoal e profissional. Também à Professora Maria Helena Bondanese Zanettini, pela orientação, ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Aos Professores do PPG em Fitotecnia e outros PPGs da UFRGS onde cursei disciplinas, pelos ensinamentos e discussões engrandecedoras. Também à Pesquisadora Ph.D. Luisa Abruzzi, pela parceria no desenvolvimento do trabalho e apoio em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo e apoio financeiro concedido, durante o período de Doutorado e Doutorado Sanduíche no Exterior.

Aos servidores e técnicos administrativos do Departamento de Plantas de Lavoura e do PPG em Fitotecnia, pela prestatividade, ajuda e amizade.

Aos colegas do PPG em Fitotecnia, pela amizade, conhecimentos compartilhados e pela agradável convivência. Em especial, aos amigos André, Kelly, Danielle, Catarine, Silmara, Franciane, Carolina e Cátia.

Ao Dr. Zenglu Li, pela coorientação durante o período de Doutorado Sanduíche no Exterior na Universidade da Georgia, Athens/Estados Unidos e aos colegas da mesma Universidade, pela ativa troca de experiências e pela amizade.

Aos meus pais, Jorge Giordano e Ester Giordano, minha tia Diva Giordano pelas palavras de conforto, pelo incentivo e pela compreensão dos momentos de ausência.

Aos amigos que acompanharam e participaram dessa caminhada, em especial a Miriana, Raquel, André, Diana, Érica, Lucas e Carina.

Ao meu companheiro Manuel Suarez pelo apoio, carinho, amor e incentivo em todos os momentos.

À sociedade brasileira, que, através da CAPES, financiaram esta pesquisa.

À Deus, pela vida, e por me conduzir nas melhores escolhas.

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES E IDENTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E VALIDAÇÃO DE SNPS EM GENES ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA DA SOJA AO EXCESSO HÍDRICO¹

Autor: Cecilia Giordano

Orientador: Christian Bredemeier

Coorientadora: Maria Helena Bodanese Zanettini

RESUMO

A soja é uma leguminosa de grande adaptabilidade climática, sendo uma das oleaginosas mais consumidas e cultivadas no mundo. Entretanto, a produtividade de grãos de soja é afetada por diversos estresses abióticos, entre os quais, está o excesso hídrico. Apesar da variabilidade genética, a soja é considerada sensível ao excesso hídrico e existe crescente demanda por genótipos de soja adaptados, bem como, o entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância a este estresse. O objetivo do presente estudo foi estudar as respostas fisiológicas e moleculares de genótipos de soja ao excesso hídrico. Nesse sentido, genótipos foram avaliados em relação a tolerância ao excesso hídrico em experimentos a campo, condições controladas. Os parâmetros fisiológicos utilizados foram a fluorescência da clorofila, nitrogênio acumulado na parte aérea, atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para análise molecular foram coletadas folhas para realização do sequenciamento do RNA (RNAseq). A fluorescência da clorofila se mostrou eficiente na caracterização do estresse provocado pelo excesso hídrico, mostrando diferença significativa entre os genótipos. Os resultados em relação à atividade a enzima APX e conteúdo de H_2O_2 sugerem que no genótipo tolerante a produção de H_2O_2 pode estar atuando na percepção e sinalização do estresse. Os genótipos estudados apresentam modificações no perfil da expressão de genes em resposta ao alagamento. A utilização do Transcriptograma se mostrou uma ferramenta eficiente que fornece um representativo perfil global de expressão gênica. Apesar da tolerância ao alagamento ser uma característica complexa e de caráter quantitativo, isto é, regulada por diversos genes, foram identificados alguns genes candidatos da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno, calmodulina e proteínas de choque térmico apresentaram aumento da expressão no genótipo tolerante em resposta ao excesso hídrico. Foram identificados 23 marcadores SNPs, presentes apenas no genótipo tolerante, homocigotos e com anotação funcional para resposta a estresses abióticos. Para validação dos marcadores foram desenvolvidos ensaios de competição de alelos (KASP). Dois marcadores SNPs GSM0612 e GSM0613 apresentaram associação significativa com fenótipos tolerantes, ambos estão localizados no gene Glyma03g004100, uma proteína calmodulina, que pode estar associada a rotas de sinalização mediadas por cálcio.

¹Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (120f.) Julho, 2018.

PHYSIOLOGICAL RESPONSE, DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION, SNP IDENTIFICATION AND MARKER ASSAY DEVELOPMENT FOR FLOODING TOLERANCE IN SOYBEAN¹

Author: Cecilia Giordano

Advisor: Christian Bredemeier

Co-advisor: Maria Helena Bodanese Zanettini

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is a legume of high protein value and great climatic adaptability, being one of the most consumed and cultivated oilseeds in the world. Flooding is a frequent environmental stress that reduces soybean growth and affects nutrient, and water uptake, and grain yield of soybean in many producing areas in the world. Characterization of genomic regions underlying the flooding tolerance will facilitate development of soybean varieties for flooding tolerance. The present study aims to characterize physiological and molecular responses to flooding stress in soybean. Genotypes with contrasting flooding tolerance were grown on field and controlled conditions, the genotypes were subjected to flooding, then leaves and roots were collected at 24 and 48 h after flooding stress, respectively, and used for physiological evaluations and RNAseq analysis. Physiological traits including chlorophyll fluorescence, N uptake, APX activity and H₂O₂ content were collected. Chlorophyll fluorescence was an efficient parameter to characterize the flooding stress. The sensitive cultivar showed decrease in quantum yield than tolerant cultivar in response to flooding. APX activity only raised in the sensitive genotype. After flooding, the sensitive genotype showed an increase in H₂O₂, while the tolerant showed a decrease. This result indicates that H₂O₂ may act as a signaling molecule in the tolerant genotypes. RNAseq analysis identified genes that in response to flooding stress showed the expression profile with expression levels statistically altered. The Transcriptogramer tool provided transcriptome data in a genome-wide scale, providing a wide biological scenario. From these data, also has identified 23 SNPs in putative genes responsible for flooding tolerance. The results are being validated with other genotypes. Therefore, were selected and identified SNPs in candidate genes differently expressed under flooding stress, only the SNPs with presence in tolerant genotype and with functional annotation in abiotic stress response. After applying several filters, it were selected 23 SNPs in putative genes responsible for flooding tolerance. Were developed Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) assays and two of these SNP markers, designated as GSM0612 and GSM0613, both located in a Calcium Binding Protein that could be associated with calcium cell signaling pathways.

¹Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (120p.) July, 2018.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Aspectos gerais da cultura da soja	6
2.2 Análise da fluorescência da clorofila como parâmetro de identificação do estresse em plantas de soja	7
2.3 A cultura da soja em condição de deficiência de O ₂	9
2.4 Sinalização e transdução de sinal em resposta à hipóxia	11
2.5 Análise de transcriptoma e identificação de SNPs	16
2.6 Transcriptograma	19
2.7 Referências bibliográficas	20
Resposta de genótipos de soja ao excesso hídrico em um gleissolo	29
3.1 Introdução	30
3.2 Material e Métodos.....	32
3.2.1 Local de execução do experimento.....	32
3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental	33
3.2.3 Parâmetros avaliados.....	35
<i>Determinação de reflectância do dossel (NDVI)</i>	35
<i>Fluorescência da clorofila</i>	35
<i>Rendimento de massa seca (ms) da parte aérea</i>	36
<i>Sobrevivência de plantas</i>	36
<i>Rendimento de grãos e seus componentes</i>	36
3.2.4 Análise estatística.....	37
3.3 Resultados e Discussão.....	38
3.3.1 Parâmetros fisiológicos	38
3.3.2 Rendimento de grãos	43

	Página
3.4 Conclusões.....	45
3.5 Referências bibliográficas	46
Análise da expressão diferencial de genes e identificação, seleção e validação de SNPs em genes envolvidos à tolerância ao excesso hídrico em soja	49
4.1 Introdução	50
4.2 Material e Métodos.....	56
4.2.1 Local do experimento	56
4.2.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	57
4.2.3 Análise dos parâmetros fisiológicos	59
4.2.4 Análise molecular	61
4.2.5 Análise da biblioteca de SNPs e seleção de genes candidatos	64
4.2.6 Genotipagem – Ensaio KASP	65
4.2.7 Validação dos marcadores SNPs.....	67
4.3 Resultados e Discussão.....	68
4.3.1 Parâmetros Fisiológicos	68
4.3.2 Análise molecular	77
4.3.3 Análise do Transcriptograma.....	78
4.3.4 Identificação e validação de marcadores SNPs em genes candidatos ...	90
4.4 Conclusões.....	92
4.5 Referências bibliográficas	93
5 Conclusões gerais	Erro! Indicador não definido.

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

TABELA 1. Rendimento de massa seca da parte aérea de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico. Cachoeirinha 2015/16.....	42
TABELA 2. Sobrevivência de plantas em seis genótipos de soja em função do excesso hídrico. Cachoeirinha, rs, 2015/16.....	43
TABELA 3. Rendimento de grãos de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico. Cachoeirinha, 2015/16.....	44
TABELA 4. Componentes de rendimento de grãos de seis genótipos de soja função do excesso hídrico. Cachoeirinha, 2015/16.....	45

CAPÍTULO II

TABELA 1. Exemplo de <i>primers</i> para ensaio de marcadores kasp, detalhes em verde correspondem a fluorescência fam e vic.....	66
TABELA 2. Estatística do sequenciamento do transcriptoma.....	77
TABELA 3. Expressão diferencial de genes em função do excesso hídrico.....	78
TABELA 4. Genes diferencialmente expressos (degs) em resposta ao alagamento, comparação relativa ao genótipo tolerante na condição controle.....	84
TABELA 5. Relação entre os marcadores snp gsm0612 e gsm0613 e os dados de fenotipagem da população proveniente de Benning x PI 46937.....	91

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Experimento com seis genótipos de soja sob excesso hídrico em um gleissolo, safra 2015/2016, EEA/IRGA (Cachoeirinha-RS).....34

FIGURA 2. Rendimento quântico (*yield*) de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico, as avaliações foram realizadas 08/01 e 11/01 (1 e 4 dias após início da inundação, respectivamente) e no dia 14/01 (3 dias após a drenagem). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste *t* ($p=0,05$). Ns: não significativo ($p>0,05$). EEA/IRGA, Cachoeirinha-RS.....39

39

FIGURA 3. Índice de vegetação por diferença normalizada (ndvi) relativo ao controle, cada leitura de cada genótipo foi analisada em relação ao seu respectivo controle. As setas no gráfico indicam o momento do início do excesso hídrico e o momento da drenagem da lâmina de água. **, * indicam significância de 1% e 5%, respectivamente. Cachoeirinha, 2015/16.....40

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Experimento com dois genótipos de soja (tecirga 6070 e fundacep 62) em resposta ao excesso hídrico, na área externa do laflor, faculdade de agronomia, em Porto Alegre-RS.....57

FIGURA 2. (A) ensaios kasp utilizando robô mantis. (B) gráfico da genotipagem com o marcador snp gsm0612 em genótipos contrastantes. Para este snp, os genótipos tolerantes, tecirga 6070 e benning apresentaram “aa”, os genótipos sensíveis, fundacep 62, syn 1359 e pi416937 apresentaram “gg”.....67

FIGURA 3. Rendimento quântico (*yield*) de dois genótipos de soja em função do tempo de inundação. * indica diferença significativa entre os tratamentos. Ns: não significativo ($p>0,05$). Porto Alegre, RS, 2014/2015.....70

Figura 4. (A) conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (B) atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em duas cultivares de soja em resposta ao excesso hídrico relativos ao controle, cada cultivar foi comparada ao seu respectivo controle. ***, **, * indicam significância de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente. Porto Alegre, RS, 2014/2015.....72

FIGURA 5. Nitrogênio (N) acumulado na parte aérea, relativo ao controle, de duas cultivares de soja em função do tratamento de excesso hídrico. Avaliações realizadas 48h após a drenagem dos tanques e durante o florescimento. ** indica diferença significativa entre as cultivares ($p<0,01$). Porto Alegre, RS, 2014/2015.....76

FIGURA 6. A lógica biológica da lista ordenada de genes. Da esquerda para a direita, os perfis de densidade do enriquecimento funcional indicam uma lógica biológica.....80

FIGURA 7. (A) Análise do transcriptograma comparando os genótipos tecirga 6070 e fundacep 62, tolerante e sensível, respectivamente, na condição controle, onde a linha azul representa o perfil de expressão do genótipo sensível (cs) relativo ao genótipo tolerante (ct) representado pela linha verde. (B) perfil de densidade de enriquecimento funcional para *Glycine max*.....81

FIGURA 8. (A) Análise do transcriptograma comparando os genótipos TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, tolerante e sensível, respectivamente, na condição de alagamento, ambas as amostras relativas ao genótipo tolerante na condição controle. (B) perfil de densidade de enriquecimento funcional para <i>Glycine max</i>	83
Figura 9. (A) análise do transcriptograma da resposta ao alagamento nos genótipos TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, tolerante e sensível, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles, onde a linha azul representa o perfil de expressão do genótipo tolerante em comparação ao seu respectivo controle, a linha vermelha representa o genótipo sensível em comparação ao seu respectivo controle. (B) perfil de densidade de enriquecimento funcional para <i>Glycine max</i>	85
FIGURA 10 Análise do enriquecimento funcional de termos de ontologia gênica para processos biológicos, no genótipo tolerante (TECIRGA 6070) em resposta ao alagamento.....	87
FIGURA 11. Esquema de representação gráfica mostrando a posição dos dois snps no gene glyma03g004100. Regiões em vermelho representam éxons e regiões em preto representam íntrons e/ou utrs.....	91

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa de alto valor proteico e grande adaptabilidade climática, sendo uma das oleaginosas mais consumidas e cultivadas no mundo. Na safra 2017/18, foram produzidas mundialmente 336 milhões de toneladas de grãos de soja. O Brasil é o segundo maior produtor mundial e se tornou, a partir da safra 2012/13, o maior exportador mundial de soja, exportando aproximadamente 42 milhões de toneladas do grão nesse ano. Na última safra, o Brasil exportou cerca de 68 milhões de toneladas de soja em grãos (COMPANHIA..., 2018).

A produtividade de grãos de soja é afetada pela ocorrência de diversos estresses abióticos, como temperaturas extremas do ar, salinidade, metais pesados, seca e inundações, entre outros (Wang *et al.*, 2003). O excesso hídrico é um estresse de ocorrência frequente que reduz o rendimento de grãos da cultura em muitas áreas produtoras desta oleaginosa no mundo, tais como na região do delta do rio Mississipi (Estados Unidos), no sudeste asiático e na região sul do Brasil. Nestas regiões, a soja é cultivada em áreas de terras baixas em rotação de culturas com o arroz irrigado. Contudo, os solos de áreas de terras baixas

apresentam reduzida drenagem natural e estão sujeitos à ocorrência de períodos temporários de alagamento, especialmente após eventos de precipitação pluvial intensa. Além disso, espera-se aumento na frequência destes eventos extremos de precipitação pluvial como resultado do processo de aquecimento global (Field *et al.*, 2012).

A rotação de culturas com soja em áreas de arroz irrigado foi motivada pela possibilidade de diminuição do banco de sementes de plantas daninhas nas lavouras de arroz irrigado, especialmente de arroz-vermelho, além do aumento e diversificação de renda na propriedade rural. Assim, a rotação em áreas de arroz irrigado se apresenta como uma oportunidade ímpar para recuperar e/ou consolidar a sustentabilidade do processo de produção de grãos neste ambiente.

Desde a safra 2010/11, a área cultivada com a cultura da soja na região sul do Brasil apresenta crescimento, principalmente em áreas antes utilizadas apenas com o arroz irrigado e/ou com pecuária de corte (COMPANHIA..., 2016), sendo que a área de rotação com soja corresponde a, aproximadamente, 30% da área cultivada anualmente com arroz irrigado (Zanon *et al.*, 2015). Nesse contexto, existe crescente demanda por genótipos de soja adaptados às condições de solos de terras baixas e a necessidade de entendimento dos mecanismos de tolerância das plantas ao estresse por excesso hídrico.

A caracterização das respostas fisiológicas das plantas ao estresse é de extrema importância para identificação de genótipos tolerantes. Entretanto, em plantas a tolerância ao estresse por excesso hídrico tem se mostrado um processo

complexo que envolve uma série de mecanismos de adaptação para lidar com a hipóxia provocada pelo alagamento. Estes mecanismos incluem adaptações morfológicas e metabólicas, tais como indução de enzimas da rota fermentativa e modificações estruturais, como presença de aerênquima e formação de raízes adventícias (Drew, 1997).

O consumo de oxigênio (O_2) pelas raízes e microrganismos do solo pode resultar na condição de hipóxia em 24 horas após o início da inundação do solo (Thomas, 2004). Entretanto, além da deficiência de O_2 , ocorrem também modificações químicas no solo nesta condição, aumentando a disponibilidade de elementos que podem ser tóxicos para as plantas, como o manganês (Mn^{2+}) e o ferro (Fe^{2+}), e aumento gradativo de gases, como amônio (NH_4^+), metano (CH_4) e gás sulfídrico (H_2S) (Costa, 1996; Liesack *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001).

A percepção do estresse e a transdução de sinais são passos importantes na determinação da tolerância de plantas expostas ao excesso hídrico (Chinnusamy *et al.*, 2004). A primeira resposta da planta em condição de alagamento é metabólica. Em período relativamente curto de exposição ao estresse, a planta identifica a falta de O_2 comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória e ativa uma reconfiguração bioquímica e fisiológica, a qual se reflete em respostas moleculares como indução de genes relacionados a rotas fermentativas e glicolíticas (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Bailey-Serres & Voeselek, 2008; Reena *et al.*, 2011).

A modificação da expressão gênica é dependente de duas fases principais, a transcrição e a tradução. O fenótipo da planta resulta basicamente da interação do genótipo com o ambiente em que a planta se desenvolve. Nesse contexto, a análise do transcriptoma tem se mostrado como uma alternativa para o estudo da expressão gênica. O transcriptoma é um completo conjunto de transcritos nas células, tanto em termos de tipo como em quantidade, em um dado momento de desenvolvimento e condição fisiológica (Nagalakshmi *et al.*, 2010; Levin *et al.*, 2010).

O advento de sequenciadores de nova geração tem revolucionado a forma pela qual transcriptomas de eucariotos podem ser analisados (Morozova & Marra, 2008). O desenvolvimento de métodos de RNA-seq faz uso de tecnologias de sequenciamento que proporcionam o direto sequenciamento de sequências complementares de DNAs (cDNAs) geradas a partir do mRNA alvo. RNA-seq gera uma abrangente visão tanto da estrutura transcripcional como do nível de expressão dos transcritos (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

A análise do transcriptoma possibilita também o estudo de SNPs (do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”), visando à identificação de potenciais marcadores moleculares. Os SNPs têm como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Em função disso, os SNPs têm sido pesquisados e utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético assistido (MAS, do inglês “*Molecular*

Assisted Selection”). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente, são encontradas apenas duas variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um par G/C), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória. Na maior parte das vezes, entretanto, são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (Gaut & Clegg, 1993; Rafalski, 2002). Assim, os SNPs encontrados em genes candidatos aumentam a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo (Ganal *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Os objetivos do presente trabalho foram estudar as respostas fisiológicas e as modificações na expressão de genes em genótipos de soja submetidos ao excesso hídrico em solo característico de terras baixas.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Comparar a resposta fisiológica de genótipos de soja ao excesso hídrico em um gleissolo.
- Estudar a expressão diferencial de genes para a identificação de genes candidatos à tolerância ao excesso hídrico em soja.
- Identificar e validar SNPs não alélicos entre cultivares contrastantes de soja em relação à tolerância ao excesso hídrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma espécie leguminosa pertencente à família Fabaceae e à subfamília Papilionoideae (Carvalho Filho & Amabile, 1996). O grão de soja é a maior fonte de proteínas e óleo que impulsiona diversos complexos produtivos, como, por exemplo, da carne e do leite (FOOD..., 2015). A cultura é uma das mais importantes no mundo, sendo que a produção mundial de grãos de soja na safra 2016/2017 foi de 351,3 milhões de toneladas. No Brasil, a produção na safra de 2016/2017 foi de 113,9 milhões de toneladas e estima-se a produção de 114,9 milhões de toneladas na safra 2017/2018 (COMPANHIA..., 2018).

Nos últimos 50 anos, eventos extremos, como secas e inundações, estão mais frequentes e intensos. O painel intergovernamental sobre as mudanças climáticas (IPCC) prevê, em função da ação antropogênica, aumento contínuo destes eventos extremos (Field *et al.*, 2012; Hirabayashi *et al.*, 2013). Assim como a maioria das espécies produtoras de grãos, a soja é considerada sensível ao estresse causado pelo excesso hídrico (Scott *et al.*, 1989; Russell *et al.*, 1990;

Drew, 1997), sendo que períodos de alagamentos ou inundações podem afetar o desenvolvimento e o rendimento de grãos da cultura (Oosterhuis *et al.*, 1990). O excesso hídrico é prejudicial para o crescimento das raízes, formação de nódulos para a fixação biológica de nitrogênio atmosférico e assimilação de carbono em soja (Thomas *et al.*, 2005; Cho & Yamakama, 2006).

O excesso hídrico afeta diversas áreas produtoras desta oleaginosa no mundo, tais como na região do delta do rio Mississipi (Estados Unidos), no sudeste asiático e na região sul do Brasil (Scott *et al.*, 1989; Rhine *et al.*, 2010; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Zanon *et al.*, 2015). Nestas regiões, a soja é frequentemente cultivada em áreas de terras baixas em rotação de culturas com o arroz irrigado. Contudo, os solos de áreas de terras baixas apresentam reduzida drenagem natural e estão sujeitos à ocorrência de períodos temporários de alagamento, especialmente após eventos de precipitação pluvial intensa (Pauletto *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2017).

2.2 Análise da fluorescência da clorofila como parâmetro de identificação do estresse em plantas de soja

As plantas possuem dois complexos fotoquímicos, chamados fotossistemas I e II. Estes complexos fotoquímicos atuam em série para realizar as reações de armazenamento da energia proveniente da fotossíntese na forma de ATP. Os fotossistemas funcionam de forma independente e complementar, sendo que no fotossistema I ocorre a absorção da luz com comprimentos de onda de 700 nm e,

no fotossistema II, ocorre a absorção de comprimentos de onda de 680 nm. Em ambos, a primeira reação é a transferência de elétrons excitados pela luz dos centros de reação, chamados P680 e P700 para os fotossistemas II e I, respectivamente, para a cadeia transportadora de elétrons (Rohacek *et al.*, 2008). Os centros de reação são um complexo de moléculas de clorofilas unidas a proteínas e quinonas, que podem ser oxidadas ou reduzidas, aceitando ou doando elétrons. A fonte de elétrons é a água e o receptor final é o NADP⁺, o qual é reduzido a NADPH (Taiz & Zieger, 2009).

O processo conhecido como fluorescência se refere à parte da energia absorvida pelas moléculas de clorofila que é dissipada na forma de radiação. Os elétrons, quando recebem a energia da luz, passam de um estado normal para um estado excitado. Quando estes elétrons voltam ao seu estado normal, parte da energia que não é utilizada para a conversão em ATP e NADPH₂ é liberada na forma de radiação e caracteriza o processo de fluorescência (Maxwell & Johnson, 2000).

A medição da fluorescência da clorofila em plantas é uma ferramenta utilizada para estudar o estado de estresse de uma planta, avaliando o balanço de energia do complexo fotossintético (Strasser *et al.*, 1995; Lazár, 1999). Moléculas de clorofila absorvem a energia da luz, que pode ser usada para a atividade fotossintética da folha, ser dissipada na forma de calor ou ser reemitida como fluorescência. Assim, pela medição da fluorescência da clorofila A é possível obter informação sobre a eficiência da fotossíntese e da dissipação de energia

fotoquímica que ocorre nas folhas (Wagner *et al.*, 2014). Os parâmetros de fluorescência têm sido relacionados à taxa de assimilação fotossintética de CO₂ das folhas (Baker & Rosenqvist, 2004) e amplamente utilizados para estudar o desempenho fotossintético das folhas (Baldassarre *et al.*, 2011).

Sendo assim, a sensibilidade de fluorescência da clorofila a perturbações no metabolismo, acoplada com a facilidade e a rapidez com que as medições podem ser feitas, torna potencialmente útil esta ferramenta para identificação, de forma não destrutiva, de perturbações metabólicas nas plantas (Barbagallo *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2014).

2.3 A cultura da soja em condição de deficiência de O₂

O excesso hídrico é prejudicial para a maioria das plantas cultivadas, primeiramente em função da baixa disponibilidade de oxigênio (O₂). A difusão do O₂ atmosférico diminui drasticamente em ambientes saturados por água e as trocas gasosas são reduzidas a níveis extremamente baixos. O consumo de O₂ pelas raízes, fauna e microrganismos do solo pode resultar no esgotamento de O₂ do solo em período de até 24 h após início da inundação (Thomas *et al.*, 2005). Nestas condições, a disponibilidade de oxigênio é muito baixa e o ambiente radicular torna-se hipóxico, sendo que a condição de hipóxia é caracterizada pela concentração de O₂ acima de 0% e abaixo de 20,9%, a 20°C (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Algumas espécies desenvolveram uma série de mecanismos de adaptação para lidar com a anaerobiose provocada pelo alagamento. Estes mecanismos incluem adaptações morfológicas e metabólicas, tais como indução de enzimas da rota fermentativa e modificações estruturais, como presença de aerênquima e formação de raízes adventícias (Drew, 1997).

A adaptação metabólica pode ser associada a aumentos na taxa de fermentação, em função de incrementos na atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH). No entanto, o metabolismo anaeróbico é menos eficiente na produção de energia, se comparado ao metabolismo aeróbico (Gibbs & Greenway, 2003; Voesenek *et al.*, 2004; Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Já respostas de longo prazo estão ligadas a mudanças morfológicas (Jackson & Armstrong, 1999). Cortes anatômicos realizados em raízes adventícias de plantas de soja cultivadas sob inundação evidenciaram elevada ruptura das células do córtex, indicando a formação de aerênquima lisígeno, criando espaços vazios que servem como condutos para a transferência de O₂ para as raízes (Pires *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005).

A inundação do solo provoca drástica redução da taxa de fotossíntese e, conseqüentemente, da assimilação de carbono (Oosterhuis *et al.*, 1990; Bacanamwo & Purcell, 1999). Em soja, o estresse por excesso hídrico por 9 dias durante o período vegetativo impactou negativamente na estatura, área foliar e teor de nitrogênio (N) nas plantas em função dos dias de inundação (Cho &

Yamakawa, 2006). Quando o estresse ocorre no período reprodutivo, ocorre maior redução no rendimento de grãos. Entretanto, plantas submetidas ao excesso hídrico por período curto (48 a 96 h) não apresentaram diferenças significativas das plantas não submetidas ao estresse (Rhine *et al.*, 2010). Sendo assim, a redução do rendimento de grãos de soja varia conforme a intensidade e o estágio fenológico da cultura em que ocorre o excesso hídrico, chegando a reduções de 60% no rendimento de grãos quando ocorre no período reprodutivo (Schöffel *et al.*, 2001; Rhine *et al.*, 2010).

A deficiência de O₂ no sistema radicular também pode diminuir a formação de nódulos nas raízes e inibir a fixação simbiótica de nitrogênio, em função da exigência de O₂ no processo de fixação biológica (Amarante & Sodek, 2006). A concentração de ureídeos no xilema é fortemente relacionada à fixação biológica de N (Herridge & Peoples, 1990). Plantas de soja mantidas durante 14 dias em estresse por alagamento paralisaram o crescimento e apresentaram baixos níveis de ureídeos, indicando redução na fixação biológica de N em condições de alagamento (Thomas *et al.*, 2005).

2.4 Sinalização e transdução de sinal em resposta à hipóxia

Condições de alagamento ou inundação causam o rápido esgotamento de O₂ no solo e dificultam as trocas gasosas. A deficiência de O₂ inibe a respiração mitocondrial, resultando na alteração na expressão de genes, balanço energético, metabolismo celular, crescimento e desenvolvimento da planta (Bailey-Serres &

Chang, 2005). A mitocôndria é extremamente sensível a alterações nos níveis de O_2 e desempenha um papel crucial na percepção da hipóxia, alterando a homeostase celular. Em função da falta de O_2 na cadeia respiratória, pode também ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Navrot *et al.*, 2007).

A análise de transcriptoma em plântulas de soja submetidas à inundação por 12 horas mostrou que, nessa condição, ocorreu indução da expressão de genes relacionados com a fermentação alcoólica, síntese de etileno, defesa contra patógenos, detoxificação de EROs, chaperonas e hemoglobina não simbiótica, indicando que a rápida resposta a deficiência de O_2 pode estar relacionada com a adaptação e sobrevivência das plantas ao estresse (Komatsu *et al.*, 2009).

As principais formas de EROs são o oxigênio singlete (1O_2), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\bullet). Em células vegetais, as EROs são formadas principalmente nas mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos. Em condições de equilíbrio, as EROs produzidas são detoxificadas por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. Quando ocorre desequilíbrio entre produção e detoxificação, que podem ser causados por estresses bióticos ou abióticos, o aumento nas concentrações de EROs pode levar a peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos ao DNA e, posteriormente, morte celular (Apel & Hirt, 2004). Entretanto, estudos têm demonstrado importante papel de EROs na sinalização local e sistêmica em resposta a estresses bióticos e abióticos (Camp *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008; Gill & Tuteja, 2010; Mittler *et al.*, 2011; Baxter

et al., 2013). A formação de $^1\text{O}_2$, uma forma altamente reativa de oxigênio, a qual é produzida nos cloroplastos quando há excesso de radiação atua também na sinalização celular. Avanços no conhecimento da formação e percepção do $^1\text{O}_2$ foram obtidos com a descoberta de um mutante que produz $^1\text{O}_2$ nos cloroplastos de maneira controlada, induzindo uma série de respostas, sugerindo retro sinalização do cloroplasto para o núcleo (Fischer *et al.*, 2007).

Além disso, ocorre a produção de ROS em resposta à hipóxia pela ativação da enzima RBOH (do inglês – *respiratory burst oxidase homologue*) (Miller *et al.*, 2009). As RBOHs constituem uma família com dez genes já identificados em *Arabidopsis thaliana* e sua atividade tem sido associada com o mecanismo de defesa contra patógenos. Estudos demonstram também relação com resposta a estresses abióticos, sugerindo que RBOHs induzem sinalização sistêmica mediada pela produção de EROs (Miller *et al.*, 2009; Mittler *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2011). Em relação ao crescimento e desenvolvimento radicular, verificou-se que a perda de função da RBOH resulta na ausência de pelos radiculares e modificação na relação de crescimento e diferenciação nas raízes (Foreman *et al.*, 2003; Tsukagoshi *et al.*, 2010). Além disso, a atividade de RBOHs em células guarda foi aumentada em resposta à sinalização por ácido abscísico (ABA), gerando aumento nas concentrações de EROs, principalmente H_2O_2 (Neill *et al.*, 2008; Mittler & Blumwald, 2015). O H_2O_2 , por sua vez, regula o influxo de cálcio (Ca^+), promovendo despolarização da membrana e fechamento estomático (Kwak *et al.*, 2003). Sendo assim, as EROs desempenham papel importante na

sinalização tanto de estresses quanto de desenvolvimento e crescimento em plantas. O balanço entre produção e detoxificação das EROs é o fator decisivo que determina suas funções na sinalização e na ocorrência de dano oxidativo (Farnese *et al.*, 2016).

Em relação à sinalização, sabe-se também que o Ca^+ atua como mensageiro secundário em resposta ao excesso hídrico (Dat *et al.*, 2004). A modificação de influxo de Ca^+ na mitocôndria em resposta a hipóxia está ligada a cascatas de sinalização, modulando a expressão de genes relacionados com a biossíntese de etileno, formação de aerênquima, oxidase alternativa e calmodulina (Subbaiah *et al.*, 1994; Dat *et al.*, 2004; Bailey-Serres & Chang, 2005; Sasidharana & Mustroph, 2011).

A percepção do estresse e a transdução de sinais são características chave na determinação da tolerância de plantas expostas a condições de estresse (Chinnusamy *et al.*, 2004). A expressão de genes da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno (ERFs) apresenta papel crucial na regulação das respostas das plantas à deficiência de oxigênio (Bailey-Serres *et al.*, 2012). Em arroz, foram identificados os genes *SNORKEL1* e *SNORKEL2*, que são fatores de transcrição responsáveis pelo alongamento dos entrenós como estratégia de “escape” em situações de inundação por longos períodos de tempo (Hattori *et al.*, 2009). Já o gene *SUB1A* é responsável pela paralisação do metabolismo como estratégia de quiescência em situações de alagamentos, nas quais a planta fica completamente submersa por curto período de tempo (Xu *et al.*,

2006), ambos sendo responsivos ao etileno. Em *Arabidopsis thaliana*, foi identificado o fator de transcrição *RAP2.2*, pertencente à mesma família do *SUB1A*. O *RAP2.2* é expresso constitutivamente em raízes e responsivo ao etileno, sendo que mutantes com esse gene silenciado apresentaram menor sobrevivência de plantas em situação de hipóxia. Estes resultados mostram o envolvimento do fator de transcrição *RAP2.2* na resposta a esse estresse (Hinz *et al.*, 2010).

Estudos posteriores mostraram que *RAP2.2* atua na regulação de outros fatores de transcrição responsivos ao etileno, como *ERE1/ERE2*, também associados à resposta a condições de hipóxia em plantas (Sasidharan & Mustroph, 2011; Hess *et al.*, 2011). Além da família de ERFs, a resposta à deficiência de oxigênio em plantas é associada à expressão de *HB-1*, que é uma hemoglobina não simbiótica com alta afinidade pelo oxigênio, podendo transportá-lo mesmo quando este se encontra em concentrações muito baixas (Hebelstrup *et al.*, 2012).

Além disso, foi identificado o gene *HRU1* (*Hipóxia-Responsive Stress Universal Protein 1*), o qual é regulado pela rota de degradação NERP (*N-End Rule Pathway*) e induzido pelo estresse causado por elevada intensidade luminosa. Foi demonstrado que o gene *HRU1*, além de ser fortemente induzido pela submergência, é induzido pelo fator de transcrição *RAP2.12* e interage com as enzimas ligadas à produção de EROs, como a enzima *RBOH* (Gonzali *et al.*, 2015). A utilização de mutantes *rbohD* mostrou menor tolerância das plantas em

resposta a hipóxia, mostrando o importante papel da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na sinalização e percepção do estresse em plantas. A indução de HRU1 dependente da estabilização de *RAP2.12* em condição de hipóxia, indicando uma ligação entre a percepção da disponibilidade de O₂ e a sinalização do estresse por EROs. Alguns genes bem caracterizados em relação à indução de expressão em resposta a EROs e hipóxia, como ZAT 10, ZAT 12 e proteínas de choque térmico, não são regulados pela via de degradação NERP. Isto sugere a existência de um mecanismo de percepção da disponibilidade de O₂ específico e independente da sinalização por EROs em plantas (Gonzali *et al.*, 2015).

Assim, a presença de etileno e o “*turnover*” de ERFs, juntamente com a transdução de sinal dependente da disponibilidade de O₂ e EROs, desempenham papel crucial na rede de resposta das plantas ao estresse por hipóxia (Bailey-Serres *et al.*, 2012; Gasch *et al.*, 2016).

2.5 Análise de transcriptoma e identificação de SNPs

Sabe-se que condição de hipóxia induz a expressão de diversos genes que modulam as respostas morfológicas e fisiológicas das plantas ao estresse. A compreensão dos mecanismos de percepção e sinalização da baixa disponibilidade de O₂ não são completamente elucidadas. Nesse contexto, a análise do transcriptoma tem se mostrado como uma alternativa para o estudo da expressão gênica. O transcriptoma é um completo conjunto de transcritos nas

células, tanto em termos de tipo, como em quantidade, em dado momento de desenvolvimento e condição fisiológica (Nagalakshmi *et al.*, 2010; Levin *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de métodos de RNA-seq faz uso de tecnologias de sequenciamento que proporciona o direto sequenciamento de sequências complementares de DNAs (cDNAs) geradas a partir do mRNA alvo. RNA-seq gera uma abrangente visão tanto da estrutura transcricional, assim como do nível de expressão dos transcritos (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Análises do transcriptoma em raízes e parte aérea de plântulas de soja submetidas à hipóxia mostraram que, nessa condição, ocorreu indução da expressão de genes relacionados com a fermentação alcoólica, síntese de etileno, defesa contra patógenos, parede celular, detoxificação de EROs, chaperonas e hemoglobina não simbiótica (Komatsu *et al.*, 2009; Nanjo *et al.*, 2011, Tamang *et al.*, 2014).

Em plantas de soja em estágio vegetativo de desenvolvimento, a análise do transcriptoma identificou a redução na expressão de genes relacionados com a fotossíntese e síntese de clorofila e parede celular (Chen *et al.*, 2016). A expressão de genes de fatores de transcrição (FTs) é considerada importante na resposta a estresses, uma vez que FTs desempenham papel chave na regulação genica a nível transcricional. Em soja, genes da família ERFs (FTs responsivos ao etileno) e WRKY (FTs relacionados à sinalização sistêmica em plantas) foram diferencialmente expressos na parte aérea em resposta à hipóxia (Chen *et al.*,

2016). A análise de transcritos de dois genótipos de soja contrastantes em relação à tolerância ao excesso hídrico identificou que o genótipo tolerante apresentou menor número de genes “*up-regulated*” e maior número de genes “*down-regulated*”, quando comparado com o genótipo sensível. Análises do RNA-seq e qRT-PCR indicaram diferença na estrutura do gene de hemoglobina não-simbiótica entre os dois genótipos (Nakayama *et al.*,2017).

Além disso, a análise do transcriptoma possibilita o estudo de SNPs (do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”), visando à identificação de potenciais marcadores moleculares. Os SNPs têm como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Normalmente, SNPs são bi-alélicos, ou seja, geralmente, são encontradas apenas duas variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória. Na maior parte das vezes, entretanto, são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (Gaut & Clegg, 1993; Rafalski, 2002).

A identificação de marcadores moleculares baseados em SNPs cresceu rapidamente nos últimos anos, em função da utilização dos sequenciadores de nova geração e disponibilidade de plataformas automatizadas de genotipagem. A validação dos SNPs como marcadores moleculares associados a uma determinada característica é feita utilizando dados de fenotipagem e genotipagem

de uma população segregante ou de um painel de genótipos (Mammadov *et al.*, 2012).

A identificação de SNPs em genes candidatos surge como importante ferramenta para programas de melhoramento genético assistido. Além disso, aumenta a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo (Ganal *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012). Em soja, já foram identificados marcadores SNPs a partir de genes candidatos relacionados à tolerância ao alumínio (Abdel-Haleem *et al.*, 2014), à salinidade (Patil *et al.*, 2016), à resistência ao nematóide do cisto (Shi *et al.*, 2015) e à resistência à ferrugem asiática (Childs *et al.*, 2018).

2.6 Transcriptograma

O transcriptograma é um método para apresentar, analisar e tratar dados de transcriptoma que reduz o ruído e facilita a interpretação biológica dos resultados (Rybarczyk-Filho *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). Esse novo método utiliza o *software* Transcriptogramer, desenvolvido por pesquisadores do Instituto de Física da UFRGS, disponível em <http://lief.if.ufrgs.br/pub/biossoftwares/transcriptogramer>.

Inicialmente uma lista ordenada de genes é produzida, a partir da rede de associação proteína-proteína disponível no banco de dados livres chamado STRING (do inglês *SearchTool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) disponível em <https://string-db.org>, de tal modo que a probabilidade de que os genes que são funcionalmente associados decai exponencialmente com o

distanciamento na lista. Este ordenamento apresenta justificativa biológica, evidenciada pela segregação de diferentes funções biológicas do pelo Gene Ontology, disponível em www.geneontology.org, que é uma base de dados que classifica genes e seus produtos com base em três critérios: componente celular, função celular e processo biológico, e rotas metabólicas do KEGG, disponível em <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, um banco de dados de referência online para rotas metabólicas. Assim, perfis de transcriptograma são obtidos pela média da expressão gênica tomada sobre genes vizinhos nesta lista, de forma similar ao método de amplificação de sinal Boxcar Average. Além de aumentar a precisão das medições de expressão dos conjuntos de genes funcionalmente relacionados, o transcriptograma também melhora a reprodutibilidade das medidas (Silva *et al.*, 2014; De Almeida *et al.*, 2016).

2.7 Referências

- ABDEL-HALEEM, H. *et al.* Quantitative trait loci controlling aluminum tolerance in soybean: candidate gene and single nucleotide polymorphism marker discovery. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 33, p. 851-862, 2014.
- ALMEIDA, R. M. C. *et al.* Transcriptome analysis reveals manifold mechanisms of cyst development in ADPKD. **Human Genomics**, London, v. 10, [art.] 37, [p. 1-24], 2016.
- AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, n. 3, p. 405-410, 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

- BACANAMWO, M.; PURCELL, L. C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources, and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 334, p. 689-696, 1999.
- BAILEY-SERRES, J. *et al.* Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.
- BAILEY-SERRES, J.; LEE, S. C.; BRINTON, E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, n. 4, p. 1698-1709, 2012.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; CHANG, R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 507-518, 2005.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004.
- BALDASSARRE, V.; CABASSI, G.; FERRANTE, A. Use of chlorophyll a fluorescence for evaluating the quality of leafy vegetables. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 5, n. 6, p. 735-741, 2011.
- BARBAGALLO, R. P. *et al.* Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 485-493, 2003.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 1229-1240, 2013.
- BRITTO, D. T. *et al.* Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 98, n. 7, p. 4255-4258, 2001.
- CAMP, R. G. L. *et al.* Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 10, p. 2320-2332, 2003.

CARVALHO FILHO, A.; AMABILE, R. F. Biologia da soja. *In*: MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L. **Soja**: suas aplicações. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996. p. 23-47.

CHEN, W. *et al.* Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, [art.] 1044, [p. 1-19], 2016.

CHILDS, S. P. *et al.* Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 131, n. 1, p. 27-41, 2018.

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

CHO, W.; YAMAKAWA, T. Effects on growth and seed yield of small seed soybean cultivars of flooding conditions in paddy field. **Journal of Faculty of Agriculture**, Fukuoka, v. 51, n. 2, p. 189-193, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2015/2016: décimo segundo levantamento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**, Brasília, DF, v. 3, n. 12, p. 115-125, set. 2016. Monitoramento agrícola. Projeto Observatório Agrícola.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2017/2018: décimo primeiro levantamento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**, Brasília, DF, v. 5, n. 11, p. 102-108, ago. 2018. Monitoramento agrícola. Projeto Observatório Agrícola.

COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Evangraf, 1996. 233 p.

DAT, J. F. *et al.* Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 4, p. 273-282, 2004.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 223-250, 1997.

FARNESE, F. S. *et al.* When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant response to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, [art.] 471, [p. 1-15], 2016.

FIELD, C. B. **Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation**: special report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. 582 p.

FISCHER, B. B. *et al.* Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 29, p. 5555-5560, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; ONU. **Statistical yearbook 2015**: world food and agriculture. Rome: FAO, 2015. 236 p.

FOREMAN, J. *et al.* Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, London, v. 422, p. 442-446, 2003.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 9, p. 449-456, 2004.

GANAL, M. W.; ALTMANN, T.; RODER, M. S. SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 2, p. 211-217, 2009.

GASCH, P. *et al.* Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 28, n. 1, p. 160-180, 2016.

GAUT, B. S.; CLEGG, M. T. Nucleotide polymorphism in the *Adh1* locus of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae). **Genetics**, Oxford, v. 135, n. 4, p. 1091-1097, 1993.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, n. 1, p. 1-47, 2003.

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

GONZALI, S. *et al.* Universal stress protein *H_{RU1}* mediates ROS homeostasis under anoxia. **Nature Plants**, London, v. 1, n. 11, [art.] 15151, [p. 1-9], 2015.

HATTORI, Y. *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. **Nature**, London, v. 460, [art.] 7258, p. 1026-1030, 2009.

HEBELSTRUP, K. H. *et al.* Hemoglobin modulates NO emission and hyponasty under hypoxia-related stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5581-5591, 2012.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 495-503, 1990.

HESS, N. *et al.* The hypoxia responsive transcription factor genes *ERF71/HRE2* and *ERF73/HRE1* of *Arabidopsis* are differentially regulated by ethylene. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 143, n. 1, p. 41-49, 2011.

HINZ, M. *et al.* *Arabidopsis RAP2.2*: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 757-772, 2010.

HIRABAYASHI, Y. *et al.* Global flood risk under climate change. **Nature Climate Change**, London, v. 3, n. 9, p. 816-821, 2013.

JACKSON, M. B.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 1, n. 3, p. 274-287, 1999.

KIM, C. *et al.* No single way to understand singlet oxygen signaling in plants. **EMBO Reports**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 435-439, 2008.

KOMATSU, S. *et al.* A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 8, n. 10, p. 4766-4778, 2009.

KOMATSU, S.; SAKATA, K.; NANJO, Y. 'Omics' techniques and their use to identify how soybean responds to flooding. **Journal of Analytical Science and Technology**, Daejeon, v. 6, [art.] 9, [p. 1-8], 2015.

KWAK, J. *et al.* NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2623-2633, 2003.

LAZÁR, D. Chlorophyll-a fluorescence induction. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1412, n. 1, p. 1-28, 1999.

LEVIN, J. Z. *et al.* Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 9, p. 709-715, 2010.

- LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N. P. Microbiology of flooded rice paddies. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 625-645, 2000.
- MAMMADOV, J. *et al.* SNP markers and their impact on plant breeding. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2012, [art.] 728398, [p. 1-11], 2012.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, San Diego, v. 92, n. 5, p. 255-264, 2008.
- MILLER, G. *et al.* The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Science Signaling**, Washington, DC, v. 2, n. 84, [art.] ra45, 2009.
- MITTLER, R. *et al.* ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.
- MITTLER, R.; BLUMWALD, E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, n. 1, p. 64-70, 2015.
- NAGALAKSHMI, U. *et al.* The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, New York, v. 320, n. 5881, p. 1344-1349, 2008.
- NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, v. 89, p. 4.11.1-4.11.13, 2010.
- NAKAYAMA, T. J. *et al.* Insights into soybean transcriptome reconfiguration under hypoxic stress: functional, regulatory, structural, and compositional characterization. **PLOS One**, San Francisco, v. 12, n. 11, [art.] e0187920, [p. 1-20], 2017.
- NANJO, Y. *et al.* Transcriptional responses to flooding stress in roots including hypocotyl of soybean seedlings. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 77, p. 129-144, 2011.
- NAVROT, N. *et al.* Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 129, n. 1, p. 185-195, 2007.

- NEILL, J. *et al.* ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 395, p. 205-212, 2004.
- OOSTERHUIS, D. M. *et al.* Physiological responses of two soybean [*Glycine max* (L.) Merr] cultivars to short-term flooding. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 85-92, 1990.
- PATIL, G. *et al.* Genomic-assisted haplotype analysis and the development of high-throughput SNP markers for salinity tolerance in soybean. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 19199, [p. 1-13], 2016.
- PAULETO, E. A.; SOUZA, R. O.; GOMES, A. S. Caracterização e manejo de solos de várzea cultivados com arroz irrigado. *In*: PESKE, S. T. *et al.* **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: UFPel, 1998. 659 p.
- PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Morphophysiological changes of soybean in flooded soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 41-50, 2002.
- RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.
- REENA, N. *et al.* Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. **New Phytologist**, Oxford, v. 190, n. 2, p. 472-487, 2011.
- ROCHA, T. S. M. D. *et al.* Performance of soybean in hydromorphic and nonhydromorphic soil under irrigated or rainfed conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 52, p. 293-302, 2017.
- ROHACEK, K.; SOUKUPOVA, J.; BARTAK, M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. **Plant Cell Compartments**, Kerala, v. 37, n. 2, p. 41-104, 2008.
- RHINE, M. D. *et al.* Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean cultivars. **Irrigation Science**, Heidelberg, v. 28, p. 135-142, 2010.
- RUSSELL, D. A.; WONG, D. M. L.; SACHS, M. M. The anaerobic response of soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 2, p. 401-407, 1990.
- RYBARCZYK-FILHO, J. L. *et al.* Towards a genome-wide transcriptogram: the *Saccharomyces cerevisiae* case. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, n. 8, p. 3005-3016, 2011.

- SASIDHARAN, R.; MUSTROPH, A. Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 12, p. 4173-4183, 2011.
- SCHOFFEL, E. R. *et al.* Excesso hídrico sobre os componentes do rendimento da cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 7-12, 2001.
- SCOTT, H. D. *et al.* Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 4, p. 631-636, 1989.
- SHI, Z. *et al.* SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, London, v. 16, [art.] 314, [p. 1-12], 2015.
- SILVA, S. R. M. *et al.* Reproducibility enhancement and differential expression of non-predefined functional gene sets in human genome. **BMC Genomics**, London, v. 15, [art.] 1181, [p. 1-18], 2014.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A. G. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 61, n. 1, p. 32-42, 1995.
- SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1747-1762, 1994.
- SUZUKI, N. *et al.* Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 6, p. 691-699, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.
- TAMANG, B. G. *et al.* Physiological and transcriptomic characterization of submergence and reoxygenation responses in soybean seedlings. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v.37, n. 10, p. 2350-2365, 2014.
- THOMAS, A. L. **Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O₂**. 2004. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- THOMAS, A. L.; GUERREIRO, S. M. C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 1191-1198, 2005.

TSUKAGOSHI, H.; BUSCH, W.; BENFEY, P. N. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. **Cell**, Basel, v. 143, n. 4, p. 606-616, 2010.

VIDAL, R. O. *et al.* Identification of SNPs in RNA-seq data of two cultivars of *Glycine max* (soybean) differing in drought resistance. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 331-334, 2012.

VOESENEK, L. A. C. J. *et al.* Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. **Ecology**, Washington, DC, v. 85, n. 1, p. 16-27, 2004.

WAGNER, J. F.; MEROTTO JUNIOR, A. Parâmetros fisiológicos e nutricionais de cultivares de soja resistentes ao glifosato em comparação com cultivares isogênicas próximas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 393-399, 2014.

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

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews - Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

XU, K. *et al.* *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, London, v. 442, n. 7103, p. 705-708, 2006.

ZANON, A. J. *et al.* Desenvolvimento de cultivares de soja em função do grupo de maturação e tipo de crescimento em terras altas e terras baixas. **Bragantia**, Campinas, v. 74, p. 400-411, 2015.

3 CAPÍTULO 1

Resposta de genótipos de soja ao excesso hídrico em um gleissolo

3.1 Introdução

Aproximadamente 20% da área do estado do Rio Grande do Sul, ou seja, 5,5 milhões de hectares é composta por solos de terras baixas. Deste total, estima-se que aproximadamente três milhões de hectares possuam estrutura para irrigação e drenagem para o cultivo de arroz irrigado, sendo cultivados anualmente cerca de 1,1 milhão de hectares com esta cultura. Assim, existe potencial para uso mais intensivo destas áreas com outros cultivos em um sistema de rotação de culturas, sem interferir na área cultivada anualmente com arroz irrigado (Marchesan *et al.*, 2013).

O interesse no cultivo da soja em rotação com arroz irrigado vem crescendo de forma significativa no estado do Rio Grande do Sul. Na safra 2011/12, a área cultivada com a cultura da soja em terras baixas foi de aproximadamente 187 mil hectares, aumentando, na safra 2014/2015, para aproximadamente 300 mil hectares, representando crescimento de 60% na área cultivada (Zanon *et al.*, 2015).

Esse interesse foi motivado pela possibilidade de diminuição do banco de sementes de plantas daninhas nas lavouras de arroz irrigado, especialmente de arroz-vermelho, além do aumento e diversificação de renda na propriedade rural. Assim, a rotação de culturas em áreas de arroz irrigado se apresenta como uma oportunidade ímpar para recuperar e/ou consolidar a sustentabilidade do processo de produção de grãos neste ambiente (Correia *et al.*, 2013).

Os solos nos quais se cultiva arroz irrigado, denominados solos de terras baixas, são geralmente deficientes em drenagem natural, causada pela predominância de relevo plano associado a um perfil de solo cuja camada superficial é pouco profunda e a subsuperficial é praticamente impermeável. Por isso, essas áreas estão sujeitas ao alagamento ou inundações temporárias.

A soja apresenta variabilidade genética em relação a tolerância ao excesso hídrico (Van Toai & Beerlein, 1994; Valliyodan *et al.*, 2017), porém, apesar desta variabilidade, a soja é sensível ao excesso hídrico, sendo que períodos de alagamento do solo causam alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas que, na maioria dos casos, levam à redução no potencial produtivo da cultura (Scott *et al.*, 1989; Rhine *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2013).

Em condição de alagamento, ocorrem inicialmente alterações metabólicas na planta, como o aumento na taxa de fermentação (metabolismo anaeróbico) em função da deficiência de oxigênio. No entanto, o metabolismo anaeróbico é menos eficiente na produção de energia se comparado ao metabolismo aeróbico, limitando a disponibilidade de energia para os processos fisiológicos das plantas. Em um segundo momento ocorre adaptações morfológicas nas plantas em resposta ao alagamento, como a formação de aerênquima e de raízes adventícias (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Entretanto, estas estratégias afetam diretamente o balanço energético das plantas, podendo prejudicar seu desenvolvimento. Além disso, a deficiência de oxigênio no sistema radicular causada pelo alagamento afeta negativamente a fixação biológica de nitrogênio,

devido à necessidade de oxigênio para esse processo (Thomas *et al.*, 2005; Oliveira & Sodek, 2013).

Em função destas limitações, existe crescente demanda por genótipos de soja adaptados às condições de solos de terras baixas e a necessidade de entendimento dos mecanismos de tolerância das plantas ao estresse por excesso hídrico. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a resposta de genótipos de soja ao excesso hídrico em solo característico de terras baixas do estado do Rio Grande do Sul.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local de execução do experimento

O experimento foi conduzido a campo com a cultura da soja na safra 2015/2016, na Estação Experimental do Arroz do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA/IRGA).

A EEA/IRGA está localizada no município de Cachoeirinha, região ecoclimática da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, situada a 29°55'30'' de latitude sul e 50°58'21'' de longitude oeste e com altitude de sete metros acima do nível do mar.

O clima da região é do tipo subtropical úmido, conforme classificação climática de Koeppen, sendo considerado como de transição entre os tipos Cfa₁ (isoterma anual inferior a 18°C) e Cfa₂ (isoterma anual superior a 18°C). A

temperatura mínima média do ar é de 9,8°C, no mês mais frio (julho), e a máxima média é de 31,6°C, no mês mais quente (janeiro) (Bergamaschi *et al.*, 2003).

O solo da área experimental na EEA/IRGA é classificado como Gleissolo Háplico Distrófico típico (Streck *et al.*, 2008). Este tipo de solo ocorre em terras baixas, sendo sujeito à saturação por água ou alagamentos em períodos de elevada precipitação pluvial.

Os atributos físicos e químicos do solo da área antes da instalação do experimento foram avaliados em amostras coletadas na camada de 0-20 cm de profundidade. A análise de solo foi realizada pelo Laboratório de Análises de Solos do IRGA, tendo apresentado os seguintes valores: argila: 19%; pH_{água}: 5,4; Fósforo (Mehlich-1): 18,2 mg dm⁻³; Potássio (Mehlich-1): 27,6 mg dm⁻³, Capacidade de troca de cátions (CTC_{pH 7,0}): 7,9 cmol_c dm⁻³ e matéria orgânica: 13 g kg⁻¹. A acidez do solo foi previamente corrigida pela aplicação de calcário visando elevar o pH a 6,0.

3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Neste experimento de campo realizado na EEA/IRGA foram utilizados seis genótipos de soja: TECIRGA 6070, considerado tolerante (Lange *et al.*, 2013), BMXVALENTE e BMX PONTA, considerados intermediarias (comunicação pessoal), e NA5909, NA5959 e SYN1359, considerados sensíveis ao excesso hídrico. Foram realizados dois tratamentos de inundação do solo: testemunha (sem inundação) e excesso hídrico (quatro dias de inundação) (Figura 1).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi composta por uma área de 12 m², constituída de 4 linhas de 6 m de comprimento, espaçadas em 0,5 m. A semeadura foi realizada no dia 23/11/2015 e a densidade de semeadura utilizada foi de 30 sementes aptas m⁻². O alagamento, com lâmina de água de aproximadamente 10 cm, ocorreu quando as plantas estavam em estágio vegetativo de desenvolvimento entre V6 – V8 no dia 07/01/2016.

A escala de estádios de desenvolvimento utilizada no presente trabalho é a escala proposta por Fehr & Caviness (1977), pela qual o estágio V7, por exemplo, corresponde a sete nós no caule com folhas completamente desenvolvidas, iniciando com o nó das folhas unifolioladas.



FIGURA 1. Experimento com seis genótipos de soja sob excesso hídrico em um Gleissolo, safra 2015/2016, EEA/IRGA (Cachoeirinha-RS).

3.2.3 Parâmetros avaliados

Os parâmetros utilizados para avaliar a resposta dos genótipos de soja ao excesso hídrico foram a variação do índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI), a fluorescência da clorofila, massa seca e nitrogênio acumulado na parte aérea, sobrevivência de plantas e rendimento de grãos soja e seus componentes.

Determinação de reflectância do dossel (NDVI)

A reflectância do dossel foi avaliada pelo radiômetro Greenseeker. Este equipamento fornece o valor do “Índice de vegetação por diferença normalizada” (NDVI). O aparelho foi posicionado paralelamente às linhas da cultura, em uma altura entre 0,8 e 1,0 m acima do topo do dossel. As leituras foram realizadas por ocasião do deslocamento linear do equipamento sobre a unidade experimental, com largura útil captada pelo sensor de 0,7 a 0,8 m. Após o acionamento do sensor, ocorre a leitura de um ponto sobre o dossel a cada 0,1 segundo, totalizando cerca de 30 pontos medidos em cada unidade experimental. Foram realizadas leituras de NDVI nos dias 07/01, 08/01, 11/01, 12/01, 14/01, 18/01, 20/01, 26/01, 29/01 e 17/02, compreendendo os períodos anterior, durante e após a imposição do estresse.

Fluorescência da clorofila

Foi avaliado o rendimento quântico do fotossistema II (*Yield*) sob condições naturais de luminosidade. O aparelho utilizado para as medições da fluorescência da clorofila é o OS1-FL Chlorophyll Fluorometer (Opti-Sciences). As leituras foram

realizadas nos dias 08/01 (1 dia após início da inundação), 11/01 (4 dias após início da inundação) e 14/01 (3 dias após a drenagem). As avaliações foram realizadas sempre no mesmo horário do dia (entre 10:00 e 11:00 h).

Rendimento de massa seca (ms) da parte aérea

Foi realizada coleta de plantas em todas as unidades experimentais no dia 18/01/2016 (florescimento). A área amostrada foi de 0,5 m². As plantas foram secas em estufa a 60 °C até atingir peso constante, sendo o valor de massa seca da parte aérea na área amostrada extrapolado para kg ha⁻¹.

Sobrevivência de plantas

Foi realizada avaliação visual de sobrevivência das plantas em cada unidade experimental no dia 20/01/2016. Utilizou-se escala com variação de zero (nenhuma planta viva na parcela) a 100% (todas as plantas vivas na parcela). O percentual de sobrevivência das plantas em cada unidade experimental foi o valor médio calculado a partir dos valores percentuais de sobrevivência determinados por três avaliadores independentes.

Rendimento de grãos e seus componentes

Foi obtido através da colheita de área de 3 m², o que corresponde às duas linhas centrais de cada parcela, descontando-se as duas linhas laterais das bordaduras. Após a trilha, foi determinado o peso de grãos por unidade experimental e extrapolado para rendimento de grãos (em kg ha⁻¹), na umidade de 13%. Os componentes de rendimento analisados foram peso do grão, número de legumes planta⁻¹ e número de grãos legume⁻¹.

Antes da realização da trilha, foram amostradas 10 plantas representativas da área útil colhida para determinação dos componentes do rendimento de grãos. Nestas plantas amostradas foram realizadas as avaliações de componentes do rendimento de grãos, conforme descrito a seguir.

Número de legumes planta⁻¹: foi realizada contagem do número de legumes na amostra de 10 plantas, sendo determinada a média do número de legumes planta⁻¹.

Número de grãos legume⁻¹: foi realizada contagem do número de grãos na amostra de 10 plantas, sendo determinada a média do número de grãos planta⁻¹. O número de grãos legume⁻¹ foi determinado pela relação entre o número de grãos planta⁻¹ e o número de legumes planta⁻¹.

Peso do grão: foi determinado pela pesagem de três amostras de 50 grãos de cada unidade experimental, sendo o valor corrigido para a umidade de 130 g kg⁻¹.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F ($p \leq 0,05$), com auxílio do aplicativo ASSISTAT versão 7.6. Quando houve significância estatística, foi feita comparação entre médias dos tratamentos pelo teste t , ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Parâmetros fisiológicos

Para caracterizar o estresse e as respostas dos genótipos testados ao excesso hídrico um dos parâmetros foi a fluorescência da clorofila. Os genótipos avaliados apresentaram diferença entre si quando submetidas ao excesso hídrico (Figura 2). Na leitura realizada 1 dia após o início da inundação, o genótipo SYN 1359 e NA 5959 apresentaram maior rendimento quântico se comparadas aos outros genótipos. Esse comportamento pode ser explicado em função das características edafoclimáticas, solos característicos de terras baixas apresentam baixa capacidade de retenção de água, aliado a alta demanda atmosférica, a presença da água foi positiva em um primeiro momento. O cultivo da soja nesse tipo de solo reflete em estresse por deficiência hídrica, mesmo em anos de precipitações bem distribuídas (Rocha *et al.*, 2017). Entretanto, na avaliação realizada 4 dias após o início do estresse o genótipo SYN 1359 (considerado sensível) apresentou o menor rendimento quântico se comparado aos demais. Enquanto que, o genótipo PONTA, considerado intermediário, apresentou rendimento quântico superior às demais. Na leitura realizada 3 dias após a drenagem para avaliar a recuperação das plantas não se observou diferença significativa entre elas.

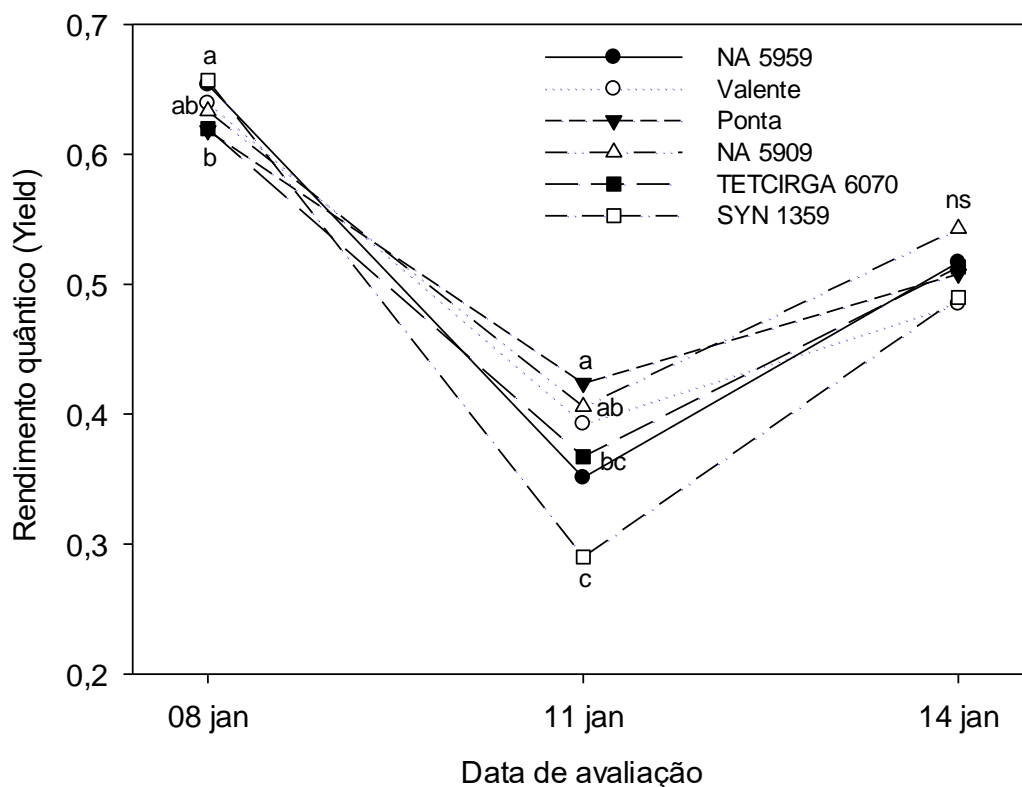


FIGURA 2. Rendimento quântico (*Yield*) de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico, as avaliações foram realizadas 08/01 e 11/01 (1 e 4 dias após início da inundação, respectivamente) e no dia 14/01 (3 dias após a drenagem). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t ($p=0,05$). ns: não significativo ($p>0,05$). EEA/IRGA, Cachoeirinha-RS.

Foram realizadas leituras de  ndice de vegeta o por diferença normalizada (NDVI) para acompanhar a resposta dos genótipos ao excesso hídrico (Figura 3). Nas primeiras leituras realizadas no primeiro dia e 1 dia após início da inunda o as plantas que foram submetidas a inunda o apresentaram valores maiores de NDVI em compara o com seus respectivos controles, nos seis genótipos. Esse comportamento sugere que as plantas estariam nesse primeiro momento se beneficiando da presença da lâmina de  gua. Já na leitura de NDVI realizada no

quarto dia após início do estresse (11/01) apenas os genótipos PONTA e NA 5909 não diferiram dos seus respectivos controles, os demais genótipos apresentaram menor NDVI em função do excesso hídrico. Nas leituras seguintes observou-se a diminuição das leituras de NDVI nos seis genótipos submetidos ao excesso hídrico por quatro dias se comparadas as plantas não inundadas, refletindo o estresse causado pela inundação. O genótipo PONTA apresentou, em duas leituras de NDVI (26/01 e 17/02), melhor recuperação que os demais genótipos, confirmando o que era visualmente perceptível no campo.

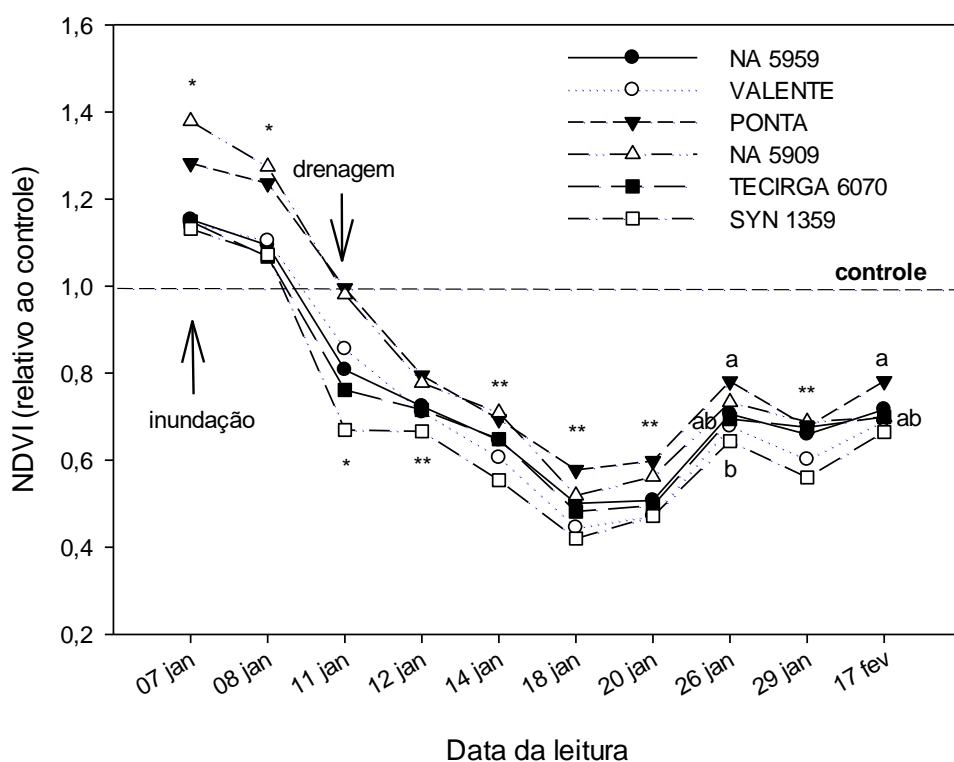


FIGURA 3. Índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) relativo ao controle, cada leitura de cada genótipo foi analisada em relação ao seu respectivo controle. As setas no gráfico indicam o momento do início do excesso hídrico e o momento da drenagem da lâmina de água. **, * indicam significância de 1% e 5%, respectivamente. Cachoerinha, 2015/16.

O rendimento de massa seca (ms) da parte aérea é um parâmetro frequentemente utilizado para avaliar o grau de estresse das plantas em função do excesso hídrico no solo. O estresse causado pelo excesso hídrico provocou diminuição de ms da parte aérea em todos os genótipos testados (Tabela 1). O oxigênio atua como acceptor final da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Em condições aeróbicas, 1 mol de hexose é convertido em, aproximadamente 30 a 32 mol de ATP. Entretanto, em condições de anaerobiose, a produção de ATP é drasticamente reduzida. Com o predomínio de processos fermentativos, são produzidos apenas 2 mol de ATP por cada mol de hexose. Sendo assim, em condições de inundação, a produção de ATP pela fosforilação oxidativo, dependente de O_2 , é inibida e a produção de ATP depende basicamente de processos anaeróbicos, como a glicólise (Buchanan *et al.*, 2000).

A redução observada no rendimento ms pode ser explicada pelo desequilíbrio no balanço energético das plantas em condições de hipóxia no ambiente radicular (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). A condição de hipóxia gerada pela inundação é caracterizada pela diminuição na concentração de oxigênio (O_2), promovendo deficiência de O_2 e causando modificações no metabolismo primário da planta.

Quando foram comparados os genótipos em cada tratamento, na condição controle (sem inundação) os genótipos VALENTE, TECIRGA 6070 e SYN 1359 apresentaram maior rendimento de ms. Quando comparados no excesso hídrico o

genótipo PONTA apresentou rendimento de ms da parte aérea superior as demais.

TABELA 1. Rendimento de massa seca da parte aérea de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico, Cachoeirinha 2015/16.

Genótipo	Tratamento de Excesso Hídrico (EH)	
	Testemunha	4 dias EH
	----- kg ha ⁻¹ -----	
NA 5959	2632 a AB	1412 b B
VALENTE	2924 a A	1549 b B
PONTA	2606 a AB	2013 b A
NA 5909	2186 a B	1710 b AB
TECIRGA 6070	3053 a A	1551 b B
SYN 1359	3007 a A	1631 b AB

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas comparam a diferença entre os genótipos em cada tratamento.

Foi avaliada a sobrevivência de plantas em função da inundação. Para tanto, foi observada a porcentagem de plantas vivas em cada unidade experimental, por meio de avaliação visual no dia 20/01/2016 (Tabela 2).

TABELA 2. Sobrevivência de plantas em seis genótipos de soja em função do excesso hídrico. Cachoeirinha, RS, 2015/16.

Genótipo	Tratamento de Excesso Hídrico (EH)		
	Testemunha	4 dias EH	Médias
	----- % -----		
NA 5959	100	52,5	76,2 ab
VALENTE	100	52,5	76,2 ab
PONTA	100	70	85 a
NA 5909	100	60	80 ab
TECIRGA 6070	100	65	82,5 a
SYN 1359	100	42,5	71,25 b
MÉDIAS	100 A	57 B	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste *t* ($p=0,05$).

Na condição controle (testemunha sem inundação), a sobrevivência das plantas foi de 100%, como esperado. Já a sobrevivência das plantas submetidas ao excesso hídrico por 4 dias foi significativamente menor, em média de 57%. Na comparação realizada entre os genótipos observou-se que nos genótipos PONTA e TECIRGA 6070 (considerados intermediário e tolerante, respectivamente) apresentaram maior sobrevivência de plantas no campo após imposição do estresse.

3.3.2 Rendimento de grãos

Em relação ao rendimento de grãos, a interação dos fatores genótipo e excesso hídrico não foi significativa, sendo significativas as diferenças entre os genótipos e entre os tratamentos de excesso hídrico. Os seis genótipos de soja analisados apresentaram diminuição no rendimento de grãos em função do excesso hídrico (Tabela 3). O rendimento médio de grãos dos genótipos nas

parcelas sem inundação foi maior do que no tratamento de 4 dias de excesso hídrico.

TABELA 3. Rendimento de grãos de seis genótipos de soja em função do excesso hídrico. Cachoeirinha, 2015/16.

Tratamento de Excesso Hídrico (EH)			
Genótipo	Testemunha	4 dias EH	Médias
Rendimento de grãos (kg ha⁻¹)			
NA 5959	3297	1558	2428 ab
VALENTE	3504	2305	2904 a
PONTA	2948	2514	2731 a
NA 5909	3063	1905	2484 ab
TECIRGA 6070	3615	2331	2973 a
SYN 1359	3231	1087	2159 b
MÉDIAS	3276 A	1950 B	

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste t ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam a diferença entre os tratamentos na coluna e letras minúsculas comparam a diferença entre os genótipos na linha.

Os genótipos VALENTE, PONTA e TECIRGA 6070 mostraram rendimento de grãos superiores e o genótipo SYN1359 apresentou desempenho inferior quando cultivado em solo característico de terras baixas.

O número de legumes planta⁻¹ variou em função dos genótipos, sendo maior na TECIRGA 6070, entretanto não apresentou diferença entre os tratamentos de excesso hídrico (Tabela 4). O número de grãos legume⁻¹ foi maior nas plantas submetidas ao excesso hídrico, provavelmente devido à mortalidade das plantas. O componente peso do grão não apresentou diferença entre os tratamentos de excesso hídrico, pois é uma característica determinada geneticamente, apresentando diferença apenas entre os genótipos.

TABELA 4. Componentes de rendimento de grãos de seis genótipos de soja função do excesso hídrico. Cachoeirinha, 2015/16.

Genótipos	Legumes planta ⁻¹ (n°)	Grãos legume ⁻¹ (n°)	Peso do grão (g)
NA5959	53 c	1,9 a	0,15 b
VALENTE	59 bc	1,8 ab	0,16 a
PONTA	62 bc	2,0 a	0,13 d
NA5909	71 ab	1,8 ab	0,14 c
TECIRGA	83 a	1,7 b	0,13 d
SYN1359	55 bc	1,8 ab	0,14 c
Tratamentos			
Testemunha	74 ns	1,7 B	0,14 ns
Excesso Hídrico	53	1,9 A	0,14
CV (%)	47,5	15,5	2,6

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste *t* ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam a diferença entre os tratamentos e letras minúsculas comparam a diferença entre os genótipos. ns = não significativo.

3.4 Conclusões

O estresse causado pelo excesso hídrico afeta a eficiência fotossintética, o acúmulo de massa seca, rendimento de grãos e sobrevivência de plantas dos genótipos de soja avaliados no presente estudo.

Neste estudo, o genótipo PONTA apresenta maior rendimento quântico da fotossíntese em comparação aos demais genótipos em resposta ao excesso hídrico por 4 dias, bem como melhor recuperação após a drenagem avaliada pelo Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) e pelo maior acúmulo de massa seca da parte aérea.

Em relação a sobrevivência de plantas, os genótipos TECIRGA6070 e PONTA apresentam maior sobrevivência quando comparadas aos demais genótipos avaliados após 4 dias sob excesso hídrico.

Outro parâmetro que apresenta diferença significativa entre os genótipos avaliados é o rendimento de grãos. Os genótipos TECIRGA 6070, PONTA e VALENTE apresentam maior rendimento de grãos em resposta ao alagamento quando comparados aos demais genótipos. Já o genótipo SYN1359 (considerada sensível ao excesso hídrico) apresenta menor rendimento de grãos em resposta ao estresse provocado pelo excesso hídrico.

3.5 Referências

AHMED, F. *et al.* Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, [art.] 9635325, [p. 1-10], 2013.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.

BERGAMASCHI, H. *et al.* **Clima da Estação Experimental da UFRGS e região de abrangência**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 78 p.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of plant Physiologists, 2000. 1367 p.

CORREIA, S. L. *et al.* Estratégias de manejo da palha de azevém para cultivo do arroz irrigado em sucessão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 37, p. 512-520, 2013.

FEHR, W.; CAVINESS, R. H. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. **Plant Science for a Better World**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1977.

LANGE, C. E. *et al.* Nova cultivar de soja TECIRGA 6070 RR desenvolvida para o cultivo em solos arroseiros gaúchos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 8., 2013, Santa Maria. **Anais [...]**. Santa Maria: UFSM, 2013. p. 196-199.

MARCHESAN, E. *et al.* Resposta de sistemas de implantação na resistência mecânica do solo a penetração e na produtividade de soja em área de várzea. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 8., 2013, Santa Maria. **Anais [...]**. Santa Maria: UFSM, 2013. p. 1120-1123.

OLIVEIRA, H. C.; SODEK, L. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism of soybean root segments. **Amino Acids**, Vienna, v. 44, p. 743-755, 2013.

RHINE, M. D. *et al.* Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean cultivars. **Irrigation Science**, Heidelberg v. 28, p. 135-142, 2010.

ROCHA, T. S. M. D. *et al.* Performance of soybean in hydromorphic and nonhydromorphic soil under irrigated or rainfed conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 52, p. 293-302, 2017.

SCOTT, H. D. *et al.* Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 4, p. 631-636, 1989.

STRECK, E. V. *et al.* **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Emater, 2008. 222 p.

THOMAS, A. L.; GUERREIRO, S. M. C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 1191-1198, 2005.

VALLIYODAN, B. *et al.* Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 8, p. 1835-1849, 2017.

VAN TOAI, T. T.; BEERLEIN, J. F. Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 1112-1115, 1994.

ZANON, A. J. *et al.* Desenvolvimento de cultivares de soja em função do grupo de maturação e tipo de crescimento em terras altas e terras baixas. **Bragantia**, Campinas, v. 74, p. 400-411, 2015.

4 CAPÍTULO 2

Análise da expressão diferencial de genes e identificação, seleção e validação de SNPs em genes envolvidos à tolerância ao excesso hídrico em soja

4.1 Introdução

O excesso hídrico afeta diversas áreas produtoras de soja no mundo, tais como na região do delta do rio Mississipi nos Estados Unidos, no sudeste asiático e região sul do Brasil (Scott *et al.*, 1989; Rhine *et al.*, 2010; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Zanon *et al.*, 2015). O excesso hídrico é prejudicial para a maioria das plantas cultivadas, primeiramente em função da baixa disponibilidade de oxigênio (O_2). A difusão do O_2 atmosférico diminui drasticamente em ambientes saturados por água e as trocas gasosas são reduzidas a níveis extremamente baixos. O consumo de O_2 pelas raízes, fauna e microrganismos do solo pode resultar no esgotamento de O_2 do solo em período de 24 h após início da inundação (Thomas *et al.*, 2005). Nestas condições, a disponibilidade de oxigênio é muito baixa e o ambiente radicular torna-se hipóxico.

A hipóxia é caracterizada pela concentração de O_2 entre $\geq 0\%$ e $\leq 20,9\%$, aumento do metabolismo anaeróbico nas plantas, aumento da produção de energia (ATP) pela glicólise, disponibilidade limitada de O_2 para fosforilação oxidativa e aumento da via fermentativa de regeneração de NAD^+ (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Sendo assim, períodos de inundação do solo são frequentemente acompanhados de redução do teor de O_2 celular, que, por sua vez, limita diretamente os processos de assimilação de carbono e de produção de ATP, afetando o crescimento e o desenvolvimento da planta (Dat *et al.*, 2004; Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Algumas espécies desenvolveram uma série de mecanismos de adaptação para lidar com a anaerobiose provocada pelo alagamento e a soja, por ser originária de áreas alagadas do norte da China, apresenta variabilidade genética em relação à tolerância ao excesso de umidade no solo (Vantoi *et al.*, 1994; Valliyodan *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos na resposta ao excesso hídrico incluem adaptações morfológicas e metabólicas, tais como indução de enzimas da rota fermentativa e modificações estruturais, como presença de aerênquima e formação de raízes adventícias (Drew, 1997). A primeira resposta da planta em condição de alagamento é metabólica. Em período relativamente curto de exposição ao estresse, a planta identifica a falta de O₂ comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória como um sinalizador.

A adaptação metabólica pode ser associada a aumentos na taxa de fermentação, em função de incrementos na atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH), piruvato descarboxilase (PDC) e lactato desidrogenase (LDH). No entanto, o metabolismo anaeróbico é menos eficiente na produção de energia, se comparado ao metabolismo aeróbico (Voeselek *et al.*, 2004).

O excesso hídrico afeta o crescimento das plantas, área foliar e teor de nitrogênio (N), acúmulo de massa seca e, conseqüentemente, o rendimento de grãos em soja (Bacanamwo & Purcell, 1999; Cho & Yamakawa, 2006; Rosa *et al.*, 2007). O estresse durante o período de crescimento vegetativo pode causar reduções de até 60% no rendimento de grãos em soja, variando conforme a intensidade e o estágio fenológico em que ocorre o estresse (Schöffel *et al.*, 2001).

A deficiência de O_2 no sistema radicular também pode diminuir a formação de nódulos nas raízes e inibir a fixação simbiótica de nitrogênio, em função da exigência de O_2 no processo de fixação biológica (Amarante & Sodek, 2006). Além disso, o alagamento induz modificações químicas no solo. Em função da ausência de O_2 , é praticamente interrompida a mineralização do nitrogênio amoniacal, sendo o nitrato (NO_3^-) é o primeiro composto a ser oxidado em ambientes anaeróbicos, seguido por MnO_2 , $Fe(OH)_3$, SO_4^{2-} e matéria orgânica. Essas reações causam alterações no pH da solução do solo, aumento nas concentrações de amônio, ferro, manganês e de outros gases, como gás carbônico (CO_2), metano (CH_4) e gás sulfídrico (H_2S) (Boru *et al.*, 2003; Liesack *et al.*, 2000). Entretanto, em plantas a tolerância ao estresse por excesso hídrico tem se mostrado um processo complexo que envolve uma série de mecanismos de adaptação para lidar com a hipóxia provocada pelo alagamento. Sendo assim, existe crescente demanda por identificação de genótipos de soja tolerantes ao excesso hídrico, bem como, pelo melhor entendimento dos mecanismos de tolerância envolvidos na resposta a esse estresse.

Acredita-se que a percepção do estresse e transdução de sinais são características chave na determinação da tolerância de plantas expostas a condições de estresse (Chinnusamy *et al.*, 2004). Dessa forma, o fenótipo tolerante resulta basicamente da interação do genótipo (genes que determinam características) com o ambiente em que a planta se desenvolve. Nesse contexto, a análise do transcriptoma tem se mostrado como alternativa para o estudo da

expressão gênica. O transcriptoma é um completo conjunto de transcritos nas células, tanto em termos de tipo como em quantidade, em dado momento de desenvolvimento e condição fisiológica (Yamada *et al.*, 2003). O advento de sequenciadores de nova geração tem revolucionado a forma que transcriptomas de eucariotos podem ser analisados (Morozova & Marra, 2008). O desenvolvimento de métodos de RNA-seq faz uso de tecnologias de sequenciamento que proporcionam o direto sequenciamento de sequências complementares de DNAs (cDNAs), geradas a partir do mRNA alvo. RNA-seq gera uma compreensiva visão tanto da estrutura transcripcional como do nível de expressão dos transcritos (Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). A análise de transcriptoma em plântulas de soja submetidas à inundação por 12 horas mostrou que, nessa condição, ocorreu indução da expressão de genes relacionados com a fermentação alcoólica, síntese de etileno, defesa contra patógenos, detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), chaperonas e hemoglobina não simbiótica, indicando que a rápida resposta a deficiência de O₂ pode estar relacionada com a adaptação e sobrevivência das plantas ao estresse (Komatsu, 2009).

Além disso, estudos demonstram que a expressão de genes da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno (ERFs) apresenta papel crucial na regulação das respostas das plantas à deficiência de oxigênio (Bailey-Serres *et al.*, 2012). Em arroz, foram identificados os genes *SNORKEL1* e *SNORKEL2*, que são fatores de transcrição responsáveis pelo alongamento dos entrenós como

estratégia de “escape” em situações de inundação por longos períodos (Hattori *et al.*, 2009). Já o gene *SUB1A* é responsável pela paralisação do metabolismo como estratégia de quiescência em situações de alagamentos onde a planta fica completamente submersa por curto período de tempo (Xu *et al.*, 2006), ambos responsivos ao etileno. Em *Arabidopsis*, foi identificado o fator de transcrição *RAP2.2*, pertencente à mesma família do *SUB1A*. O *RAP2.2* é expresso constitutivamente em raízes e responsivo ao etileno, sendo que mutantes com esse gene silenciado apresentaram menor sobrevivência de plantas em situação de hipóxia. Estes resultados mostram o envolvimento do fator de transcrição *RAP2.2* na resposta a esse estresse (Hinz *et al.*, 2010). Estudos posteriores mostraram que *RAP2.2* atua na regulação de outros fatores de transcrição responsivos ao etileno *ERE1/ERE2*, também associados a resposta a hipóxia em plantas (Sasidharan & Mustroph, 2011). Além da família de ERFs, a resposta à deficiência de oxigênio em plantas é associada à expressão de *HB-1*, que é uma hemoglobina não simbiótica com alta afinidade pelo oxigênio, podendo transportá-lo mesmo quando se encontra em concentrações muito baixas (Hebelstrup *et al.*, 2012).

Além da análise da expressão diferencial de genes, com o sequenciamento de RNA podem ser identificados SNPs (do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”), disponibilizando um banco de dados para identificação de potenciais marcadores moleculares. Os SNPs têm como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia

de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Em função disso, os SNPs têm sido pesquisados e utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético assistido (MAS, do inglês “*Molecular Assisted Selection*”). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente, são encontradas apenas duas variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória. Na maior parte das vezes, entretanto, são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (Gaut & Clegg, 1993; Rafalski, 2002). Assim, os SNPs encontrados em genes candidatos aumentam a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo (Ganal *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012).

A identificação de marcadores moleculares baseados em SNPs cresceu rapidamente nos últimos anos, em função da utilização dos sequenciadores de nova geração e disponibilidade de plataformas automatizadas de genotipagem. A validação dos SNPs como marcadores moleculares associados a uma determinada característica é feita utilizando dados de fenotipagem e genotipagem de uma população segregante ou de um painel de genótipos (Mammadov *et al.*, 2012).

A identificação de SNPs em genes candidatos surge como importante ferramenta para programas de melhoramento genético assistido. Além disso, aumenta a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo (Ganal *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2012). Em soja, já foram identificados marcadores

SNPs a partir de genes candidatos relacionados à tolerância ao alumínio (Abdel-Hallem *et al.*, 2014), à salinidade (Patil *et al.*, 2016), à resistência ao nematóide do cisto (Shi *et al.*, 2015) e à resistência à ferrugem asiática (Childs *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta ao excesso hídrico, analisar a expressão diferencial de genes e identificar genes candidatos a tolerância a esse estresse na cultura da soja. Além disso, identificar e validar SNPs a partir de genes candidatos à tolerância ao excesso hídrico, a fim de serem utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético assistido. Este avanço no conhecimento será fundamental para a identificação e desenvolvimento de genótipos de soja adaptados para cultivo em solos com má drenagem natural ou em áreas sujeitas a períodos de alagamento.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado em área da Faculdade de Agronomia/UFRGS, na parte externa (ao ar livre) do Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) (Figura 1). Foram utilizados dois genótipos de soja contrastante à tolerância ao alagamento (TECIRGA 6070, considerada tolerante e FUNDACEP 62, considerada sensível) foram cultivadas em tanques de concreto de 1,56 m³ (1.3x1.2x1.0m) cheios solo retirado da EEA/IRGA, caracterizado como Gleissolo e com as seguintes

características físicas e químicas: teor de argila = 170 g kg^{-1} ; pH = 5,4; Fósforo (P) = 70 mg dm^{-3} ; O potássio (K) = 28 mg dm^{-3} ; importa = $20 \text{ g orgânicos kg}^{-1}$. Em cada tanque foram semeadas três linhas (1,3 m de comprimento) de cada genótipo, com densidade de semeadura de $40 \text{ sementes m}^{-2}$. A adubação de base de 15, 90 e 45 kg ha^{-1} de nitrogênio, fósforo e potássio, respectivamente, foi aplicada antes da semeadura. As ervas daninhas foram retiradas manualmente e práticas usuais de controle de pragas e moléstias foram feitas quando necessário.



FIGURA 1. Experimento com dois genótipos de soja (TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62) em resposta ao excesso hídrico, na área externa do LAFLOR, Faculdade de Agronomia, em Porto Alegre-RS.

4.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos consistiram de dois regimes hídricos: testemunha (sem inundação) e excesso hídrico (24h e 48h de inundação). As plantas foram

submetidas ao excesso hídrico com lâmina de água de aproximadamente 5 cm, quando se encontravam no estágio vegetativo de desenvolvimento V6. Ambos os genótipos (tolerante e sensível) foram submetidos ao estresse hídrico por 48h de inundação. Já as plantas testemunha (sem inundação) foram mantidas com aproximadamente 85% da capacidade de campo. Para garantir essa condição às plantas controle foram irrigadas quando necessário, bem como, os tanques cobertos quando havia risco de chuvas. Após o período de inundação, os tanques foram drenados para o escoamento da água. Desde a emergência das plantas até o estágio V6, bem como após o tratamento inundações, os tanques foram regularmente irrigados, a fim de manter a umidade do solo em aproximadamente 85% da capacidade de campo. A escala de estádios de desenvolvimento utilizada no presente trabalho é a escala proposta por Fehr & Caviness (1977), pela qual o estágio V6, por exemplo, corresponde a seis nós no caule com folhas completamente desenvolvidas, iniciando com o nó das folhas unifolioladas.

Para medições fisiológicas e análise molecular, folhas e raízes foram coletadas em três momentos distintos: 24 e 48 horas de inundação, e 24 horas após a drenagem da água. Cada uma das amostras representa um grupo de duas plantas. Quatro amostras foram coletadas por dia / cultivar / tratamento (duas amostras em cada tanque).

4.2.3 Análise dos parâmetros fisiológicos

Os parâmetros utilizados para caracterizar o estresse e as respostas dos genótipos ao excesso hídrico foram a fluorescência da clorofila, atividade de enzimas de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nitrogênio acumulado na biomassa da parte aérea.

Fluorescência da clorofila: foi avaliado o rendimento quântico do fotossistema II (*Yield*) sob condições naturais de luminosidade. O aparelho utilizado para as medições da fluorescência da clorofila é o OS1-FL Chlorophyll Fluorometer (Opti-Sciences). As leituras foram realizadas no período anterior ao estresse (dia 10/02), durante o excesso hídrico (nos dias 11/02 e 12/02) e após a drenagem dos tanques (nos dias 13/02 e 14/02), visando observar a recuperação das plantas ao estresse. As leituras foram realizadas no folíolo central do último trifólio completamente desenvolvido da planta, sendo avaliadas cinco plantas em cada unidade experimental, determinando-se um valor médio por parcela. As avaliações foram realizadas sempre no mesmo horário do dia (11:00 h) e nas mesmas folhas.

Atividade enzimática APX: a atividade enzimática foi analisada a partir do extrato de proteína solúvel total. A extração da proteína foi realizada utilizando matéria fresca da folha na presença de 100 mM de tampão fosfato pH 7. O teor de proteína foi medida pelo ensaio de Bradford utilizando albumina de soro bovino como padrão.

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi ensaiada no extracto total solúvel, medindo a diminuição da absorvância a 290 nm. A mistura de reação continha 50 mM de tampão de fosfato pH 7, 500 μ M AsA, H₂O₂ 1 mM e 100 μ g de extrato de proteína total. A atividade da APX foi determinada após o esgotamento da absorvância a 290 nm utilizando um espectrofotômetro. O coeficiente de extinção do AsA (2,62 mm⁻¹ mm⁻¹) foi usada para calcular a atividade da APX.

Conteúdo de H₂O₂: para quantificar H₂O₂ foi utilizado o reagente Ampiflu™ Red (Sigma Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. O reagente foi utilizado para detectar H₂O₂ liberado a partir do extrato de proteína solúvel total.

Nitrogênio (N) acumulado na parte aérea: as amostras foram constituídas de duas plantas por repetição. As amostras foram colocadas em estufa com aeração forçada, a aproximadamente 60°C até peso constante e depois pesadas. Depois de pesadas as amostras foram moídas e homogeneizadas e o teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl, conforme descrito por Tedesco et al. (1995).

O N acumulado foi obtido a partir da associação entre o teor de N na parte aérea e o rendimento de massa seca. As plantas foram amostradas dois dias (48h) após a drenagem e durante o florescimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$), com auxílio do aplicativo estatístico ASSISTAT versão 7.6. Quando houve significância estatística do teste F, foi feita comparação entre médias pelo teste t, ao nível de 5% de significância.

4.2.4 Análise molecular

Extração de RNA e síntese de cDNA: em todos os tratamentos, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior extração de RNA. O RNA total foi extraído a partir de cada amostra utilizando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific). A quantificação do RNA foi realizada usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA foi analisada por 260/280 nm e confirmada por electroforese (0 min a 80 V e 50 min a 100 V). Antes de síntese de cDNA, o RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi obtida usando 1 µg de RNA livre de DNA, a enzima M-MLV Transcriptase Reversa System™ (Thermo Fisher Scientific) e primer oligo(dT).

RNA-seq: quatro amostras de RNA foram enviadas como material liofilizado em tubos (Biomatrica) com RNA estável para BGI (Instituto de Genômica de Pequim, China) para o sequenciamento do RNA. As bibliotecas foram construídas a partir de dois genótipos (tolerante e sensível) e duas condições experimentais (controle e 24h de inundação), e foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram tratadas com Dnase I e pérolas magnéticas de oligo (dT) foram usadas para isolar o mRNA. Misturado com tampão de fragmentação, o mRNA foi fragmentado. Então o cDNA foi sintetizado utilizando os fragmentos de mRNA como moldes.

Durante as etapas de CQ, Agilent 2100 Bioanalyzer e ABI StepOnePlus Real-Time PCR System foram utilizados na quantificação e qualificação da

biblioteca de amostras. Todas as bibliotecas foram sequenciadas utilizando o HiSeq™ 2000, BGI.

Os dados de sequenciação primários produzidos foram submetidos a um controle de qualidade (CQ). Os reads foram alinhados com as sequências de referência e os resultados incluem níveis de expressão e análise de expressão diferencial.

Projeção de primers: os pares de primers foram projetados para qPCR utilizando a ferramenta de busca Primer Quest IDT DNA (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>) e verificado quanto a presença de hetero e homodímeros (Apêndice 1).

qPCR e análise dos dados: as reações foram realizadas com StepOne Applied Biosystem Real-time Cyclers™ (Life Technologies). As condições de ciclagem do PCR foram implementadas como descrito: 5 minutos a 94 °C, seguido por 40 repetições de 10 segundos a 94 °C, 15 segundos a 60 °C e 15 segundos a 72 °C. Foi realizada análise da curva de dissociação (melting curve) no final da corrida de PCR, ao longo do intervalo de 55-99 °C, aumentando a temperatura em 0,1 °C a cada 1 segundo. Cada reação de 25 µL continha: 12,5 µL (diluição 1:50) de cDNA, tampão de PCR 1x (Thermo Fisher Scientific), 2,4 mM MgCl₂, 0,024 mM dNTP, 0,1 µM de cada primer, 2,5 µL SYBR-Green (1: 100.000, Molecular Probes) e 0,03 U de Taq DNA polimerase Platinum (5 U / µl, Thermo Fisher Scientific). Todas as reações de PCR foram realizadas em quadruplicatas técnicas. Um controle negativo foi executado sem cDNA em todos os ensaios para avaliar a

especificidade de amplificação. As análises de dados de expressão foram realizados após a quantificação comparativa dos produtos amplificados, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Análise da estabilidade de expressão de genes de referência: para selecionar os genes de referência apropriados, todos os resultados de qPCR foram comparadas usando 2 algoritmos diferentes: NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) e geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).

Transcriptograma: inicialmente, uma lista ordenada de genes foi obtida pela diagonalização com uma matriz adjacente baseada no banco de dados de interação entre proteínas chamado STRING, disponível em <https://string-db.org/>.

Foram utilizadas interações com escore de confiança superior a 800. O ordenamento foi realizado utilizando o programa Transcriptogramer, desenvolvido pelo Instituto de Física da UFRGS e disponível em <http://lief.if.ufrgs.br/pub/biossoftwares/transcriptogramer/>. Para caracterização biológica do ordenamento foram utilizadas todas as categorias de *Gene Ontology* (GO) para *Glycine max* disponíveis em AmiGO 1.8 (<http://amigo1.geneontology.org>). As GOs relacionam os genes com sua função biológica como componente celular, função molecular ou bioquímica e processo biológico. É marcado no ordenamento com 1 todo gene que participe de processo biológico e 0 para aqueles que não participam. O transcriptograma do processo biológico é realizado calculando as médias em uma janela de raio 125, o que significa que cada ponto no perfil de expressão é a média de 251 pontos. Assim, é

calculada a densidade de participação dos genes em cada processo biológico, o qual é chamado enriquecimento funcional.

4.2.5 Análise da biblioteca de SNPs e seleção de genes candidatos

Esta parte do estudo foi realizado em colaboração com Universidade da Georgia (UGA), Athens-Estados Unidos, durante período de Doutorado Sanduíche no Institute of Plant Breeding, Genetics and Genomics (IPBGG), sob orientação do Dr. Zenglu Li.

A partir dos banco de dados gerados pelo sequenciamento do RNA, descrito anteriormente neste trabalho, foi disponibilizada uma biblioteca de SNPs. Os SNPs em genes diferencialmente expressos em resposta ao alagamento foram identificados utilizando o método SAMtools (do inglês “*Sequence Alignment Map*”). Os *reads* de cada biblioteca foram ancorados no genoma da soja (*Glycine max Wm82.a2.v1*) com o *software* BWA para gerar arquivos BAM. A partir destes arquivos foram identificados SNPs com cobertura mínima de 20 *reads* em cada biblioteca. Finalmente, foram então selecionados apenas SNPs presentes no genótipo tolerante (TECIRGA 6070) e ausentes no genótipo sensível (FUNDACEP 64), após esta seleção, o número final de foi de 3000 SNPs identificados.

A partir dos 3000 SNPs selecionados foram filtrados apenas SNPs em genes com anotação funcional para resposta a estresses abióticos para reduzir o número de genes candidatos. Para isso, foi utilizada a plataforma Blast2GO e do total de genes com a presença de SNPs, apenas 38 genes apresentaram

anotação funcional para resposta a estresses abióticos (Apêndice 2). Para validação do polimorfismo, isto é, que a variação encontrada no genótipo tolerante é possui potencial para ser utilizado como marcador molecular, foram selecionados SNPs com frequências menores que 40% do total no banco de dados disponível em <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>.

Assim, 23 SNPs em 17 genes candidatos distribuídos em 11 cromossomos foram identificados e selecionados para validação.

4.2.6 Genotipagem – Ensaio KASP

A genotipagem foi realizada utilizando a plataforma KASP™ (do inglês “*Kompetitive Allele Specific PCR*”) da LCG Genomics (www.lcgg genomic.com). Este sistema de genotipagem utilizada a competição de alelos tem sido amplamente utilizado para o desenvolver marcadores moleculares baseados em SNPs em milho, arroz e soja, entre outras (Semagn *et al.*, 2014).

Marcadores SNPs foram desenhados baseados na posição do SNP no genoma e utilizando o genoma de referência *Williams 82* disponível no banco de dados PHYTOZOME. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa Primer3 e Primer Express 3.0. Foram desenhados um conjunto de três primers para cada SNP. Seguindo uma ordem prévia, o marcador SNP era nomeado, por exemplo, GSM0612, GSM0613, assim sucessivamente. Junto ao nome é descrito o cromossomo, posição e o polimorfismo da base como por exemplo Gm_03_366065_G_A, ou seja, em *Glycine max*, no cromossomo 3 posição

41006026 o polimorfismo de uma base Guanina (G) por uma Adenina (A). Foram desenhados dois *primers forward* (FAM e VIC) e um *reverse* comum (R1) (Tabela 1).

TABELA 1. Exemplo de *primers* para ensaio de marcadores KASP, detalhes em verde correspondem a fluorescência FAM e VIC.

SNP-NAME GSM0612	Gm03_366065_G_A
FAM-Forward	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACGTGAATATAGATTGTTGGCGC
VIC-Forward	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACGTGAATATAGATTGTTGGCGT
Reverse_Common_R1	CATTATGACCCAGGAGACAGCTA

A partir de um painel de 11 genótipos contrastantes e com fenótipo conhecido para tolerância ao alagamento, foram então testados os 23 marcadores SNPs desenhados para ensaio de competição de alelos para avaliação inicial de marcadores promissores (Figura 2). Os genótipos utilizados foram Willian 82, genoma de referência, NA 5959, NA 5909, SYN1359, Wooddruf, Boog e PI 416937, consideradas sensíveis, Valente e Ponta, consideradas intermediárias, TECIRGA 6070 e Benning, consideradas tolerantes ao excesso hídrico (Apêndice 3).

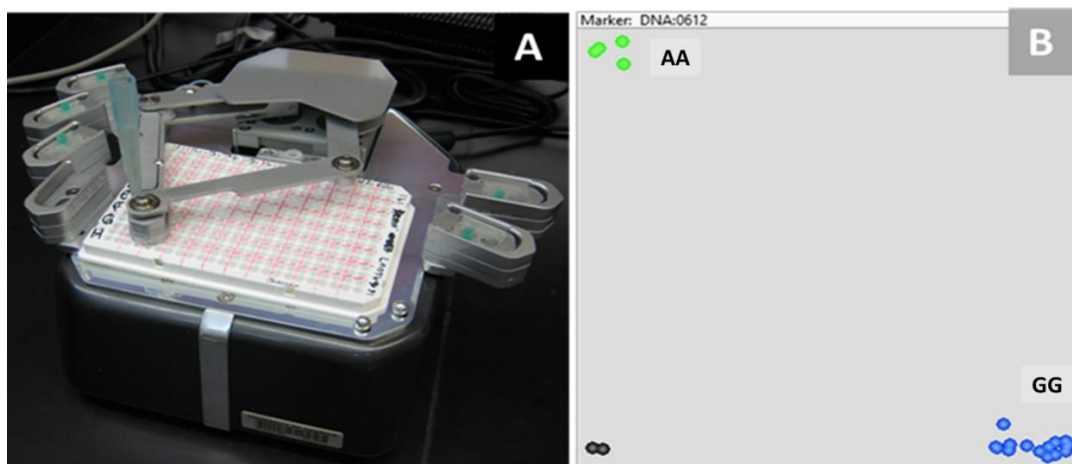


FIGURA 2. (A) Ensaios KASP utilizando robô Mantis. (B) Gráfico da genotipagem com o marcador SNP GSM0612 em genótipos contrastantes. Para este SNP, os genótipos tolerantes, TECIRGA 6070 e Benning apresentaram “AA”, os genótipos sensíveis, Fundacep 62, SYN 1359 e PI416937 apresentaram “GG”.

4.2.7 Validação dos marcadores SNPs

A validação dos marcadores SNPs considerados promissores foi realizada a partir da genotipagem de uma população F_5 proveniente das linhagens contrastantes Benning X PI 46937, tolerante e sensível ao excesso hídrico, respectivamente. Esta população de linhagens endogâmicas recombinantes (RILs, do inglês “*Recombinant inbred lines*”) foi fenotipada nos anos de 2012, 2014 e 2015, após 11 dias de alagamento no estágio de desenvolvimento R1 (Fehr & Caviness, 1977). Para fenotipagem foi utilizada escala visual com atribuição de notas, da nota zero a 9, onde 0 corresponde a plantas sem sinais de estresse e 9 corresponde a todas as plantas mortas. Além das notas foi atribuído percentual de sobrevivência de plantas em função do excesso hídrico.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Parâmetros Fisiológicos

Um dos parâmetros utilizados para caracterizar o estresse e as respostas dos genótipos testados ao excesso hídrico foi a fluorescência da clorofila. Os elétrons, quando recebem a energia da luz, passam de um estado normal para um estado excitado. Quando estes elétrons voltam ao seu estado normal, parte da energia que não é utilizada para a conversão em ATP e NADPH₂ é liberada na forma de radiação e caracteriza o processo de fluorescência.

O parâmetro avaliado foi o rendimento quântico (*Yield*) que é uma estimativa da atividade fotoquímica da planta, a qual expressa a captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do fotossistema II e pode representar a eficiência do transporte de elétrons através deste fotossistema (Maxwell & Johnson, 2000). Estudos realizados com soja, milho e tomate demonstram que a fluorescência de clorofila é um parâmetro sensível as alterações causadas pelo excesso hídrico (Jackson, 1985; Jackson & Colmer, 2005; Else *et al.*, 2009; Caudle & Maricle, 2012; Khatoon *et al.*, 2012).

As avaliações de fluorescência da clorofila foram realizadas em três momentos: no dia anterior ao estresse (tempo 0), durante o período de inundação (24 e 48h de inundação) e após a drenagem dos tanques (24 e 48h de recuperação).

O rendimento quântico avaliado no período anterior a inundação não apresentou diferença entre os genótipos e esse comportamento se manteve constante nas plantas mantidas na condição controle (Figura 3). Já entre as plantas que foram submetidas ao excesso hídrico, com 24h de inundação o genótipo sensível (FUNDACEP 62) apresentou menor rendimento quântico se comparada ao genótipo tolerante (TECIRGA 6070) na mesma condição. Com 48h de excesso hídrico não houve diferença entre os genótipos para esse parâmetro, provavelmente devido à intensidade do estresse. Após as 48h de manutenção de lâmina de água os tanques foram drenados e foram realizadas mais duas avaliações de fluorescência de clorofila, 24 e 48h após a drenagem. Na avaliação realizada 24h após a drenagem, novamente a FUNDACEP 62 apresentou menor rendimento quântico se comparada a TECIRGA 6070 na mesma condição. Na avaliação realizada 48h após a drenagem os genótipos voltaram a não diferir.

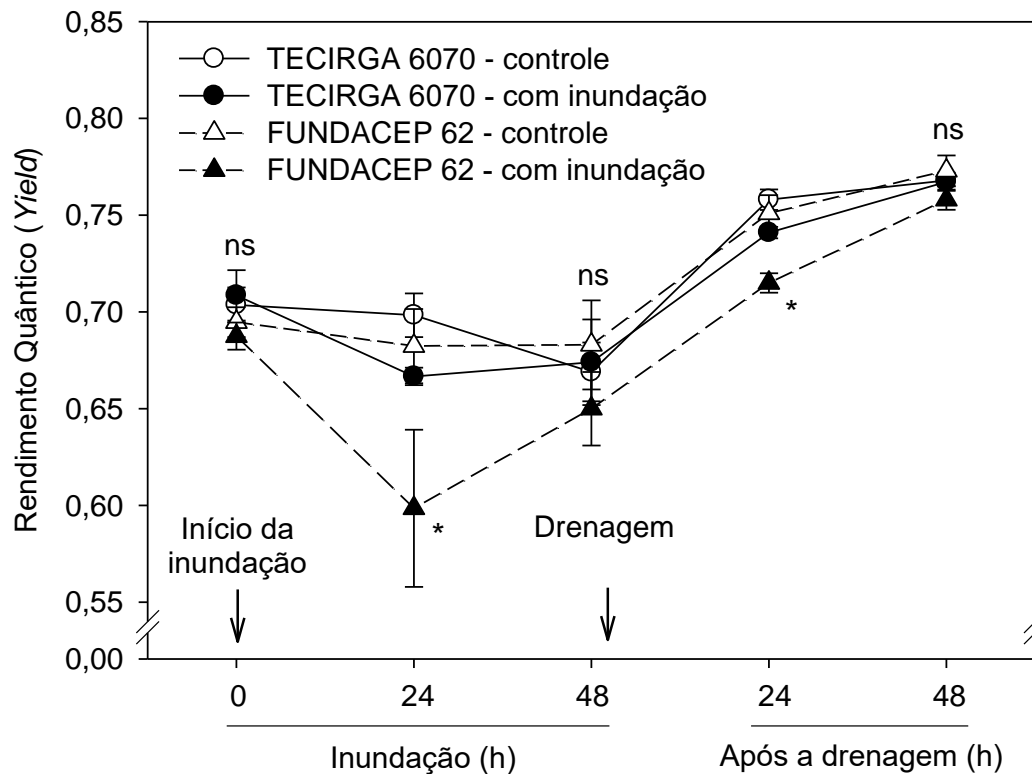


FIGURA 3. Rendimento quântico (*Yield*) de dois genótipos de soja em função do tempo de inundação. * indica diferença significativa entre os tratamentos. ns: não significativo ($p > 0,05$). Porto Alegre, RS, 2014/2015.

O consumo de O_2 pelas raízes, fauna e microrganismos do solo pode resultar no esgotamento de O_2 do solo em período de 24 h após início da inundação (Thomas *et al.*, 2005). Em função disso, a fotossíntese é inibida e a fluorescência da clorofila foi um parâmetro eficiente para caracterizar e diferenciar a magnitude do estresse causado pelo excesso hídrico entre os genótipos em dois momentos, 24h de inundação e 24h após a drenagem. O genótipo sensível, FUNDACEP 62, demonstrou queda mais acentuada no rendimento quântico

quando estressada e também recuperação mais lenta após a drenagem dos tanques.

A ocorrência de condições ambientais desfavoráveis tais como alagamento, pode induzir à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Neste estudo foi avaliado conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a atividade da enzima de detoxificação de EROs, ascorbato peroxidase (APX) (Figura 4).

O conteúdo de H_2O_2 e atividade da enzima APX das duas cultivares testadas em condições de inundação foi comparado aos seus respectivos controles em três momentos: 24h de inundação, 48h de inundação e 24h após drenagem dos tanques (Figura 4 A e B).

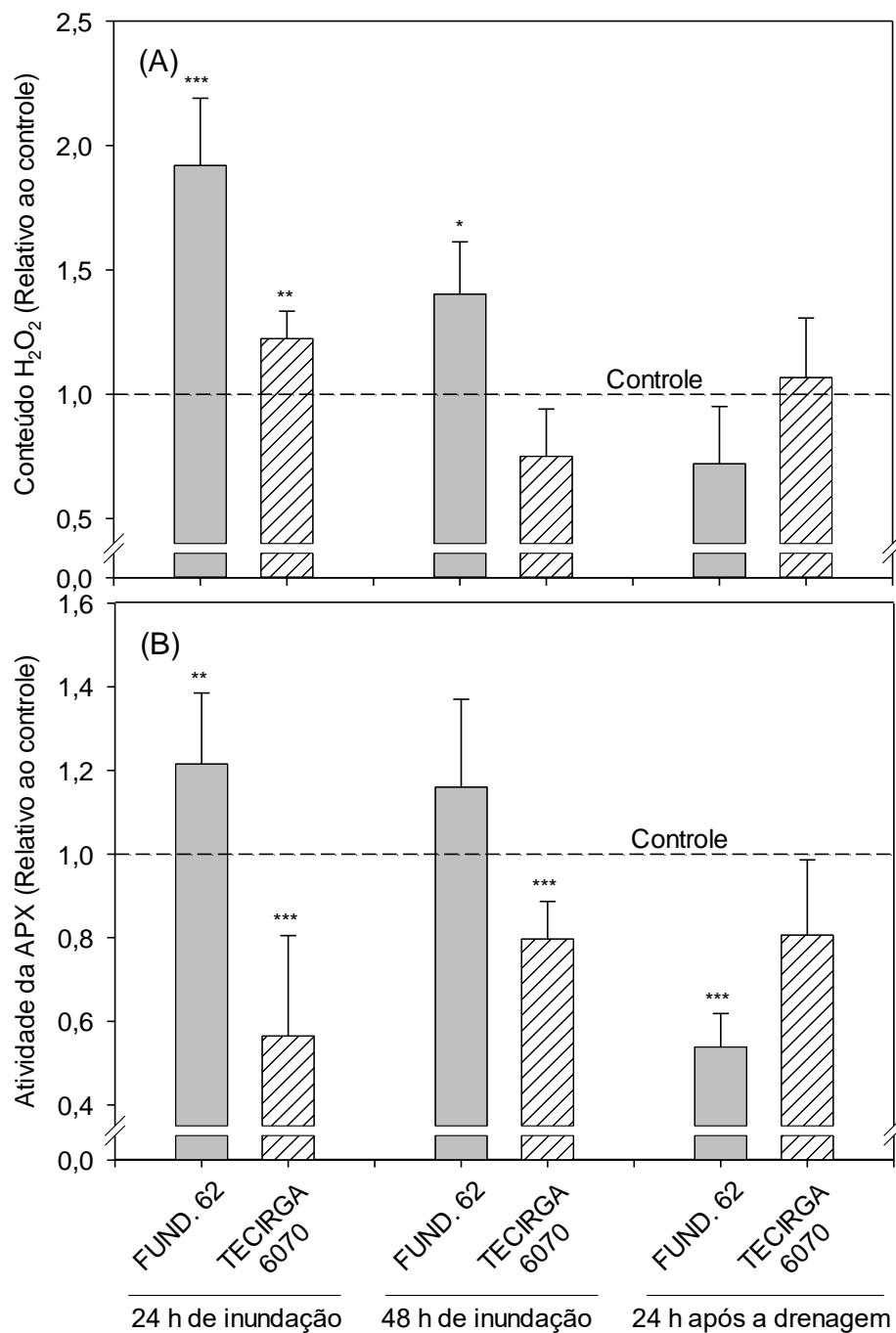


FIGURA 4. (A) Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (B) atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em duas cultivares de soja em resposta ao excesso hídrico relativos ao controle, cada cultivar foi comparada ao seu respectivo controle. ***, **, * indicam significância de 0,1%, 1% e 5%, respectivamente. Porto Alegre, RS, 2014/2015.

Em relação ao conteúdo de H_2O_2 observou-se que em plantas submetidas às 24h de inundação o conteúdo de H_2O_2 aumentou na condição de excesso hídrico em relação ao controle, em ambas cultivares. Entretanto, esse aumento foi mais acentuado na FUNDACEP 62 (sensível) do que na TECIRGA 6070 (tolerante). Na segunda avaliação realizada após 48h de inundação a FUNDACEP 62, apesar de diminuir os níveis de H_2O_2 , apresentou níveis de H_2O_2 mais elevados que as plantas controle da mesma cultivar. Já a TECIRGA 6070 o conteúdo de H_2O_2 em plantas submetidas às 48h de inundação não diferia da condição controle. Na avaliação realizada 24h após a drenagem dos tanques, o conteúdo de H_2O_2 das duas cultivares não diferiu dos seus respectivos controles.

Em relação à atividade da enzima APX, a atividade na FUNDACEP 62 apresentou aumento em função do excesso hídrico por 24h, na segunda avaliação (48h de inundação) a atividade da APX não diferiu entre as plantas sob condição de estresse e controle. Já a cultivar TECIRGA 6070 apresentou menor atividade de APX em resposta ao excesso hídrico por 24h e 48h se comparada ao seu respectivo controle. Em estudo com duas cultivares de soja Embrapa 45 e BR4, consideradas tolerante e sensível, respectivamente, foi observada inibição da atividade da enzima APX na cultivar Embrapa 45 (tolerante) em resposta a hipóxia (Nakayama *et al.*,2017). Esses resultados indicam que em cultivares de sojas tolerantes à hipóxia, em um primeiro momento, a atividade da enzima APX é inibida.

EROs são frequentemente associadas apenas ao estresse oxidativo, entretanto, estudos tem mostrado que EROs desempenham importante papel na sinalização e percepção de estresses em plantas (Suzuki *et al.*, 2011; Baxter *et al.*, 2013; Farnese *et al.*, 2016). A cultivar tolerante, TECIRGA 6070 respondeu nas primeiras 24h de estresse com aumento do conteúdo de H₂O₂, entretanto, com 48h de exposição ao excesso hídrico os níveis de H₂O₂ diminuíram, equiparando-se a condição controle. Esses resultados podem indicar a função sinalizadora do H₂O₂ em resposta ao estresse. Em *Arabidopsis thaliana*, espécie sensível ao excesso hídrico, foi identificado importante papel do fator de transcrição *RAP2.2*, da família ERF na resposta a hipóxia, onde mutantes apresentaram diminuição da sobrevivência de plantas, enquanto que, plantas com superexpressão do *RAP2.2* apresentaram aumento na sobrevivência sob hipóxia (Hinz *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que *RAP2.2* induz o gene HRU1 (do inglês *Hypoxia-Responsive Universal Stress Protein 1*) que controla a homeostase de EROs pela interação com proteínas como a RBOH, durante a deficiência de O₂ (Gonzali *et al.*, 2015). Esses resultados indicam que a sinalização sistêmica modulada por EROs está ligada à tolerância de plantas a hipóxia.

Os resultados do presente estudo em soja vão ao encontro dos resultados encontrados em *Arabidopsis*, indicando que no genótipo tolerante TECIRGA 6070 a produção de H₂O₂ pode estar atuando na percepção e sinalização do estresse.

Em relação ao nitrogênio (N) a falta de oxigênio no sistema radicular da planta de soja prejudica a nodulação e inibe a fixação biológica de nitrogênio pelas

bactérias simbiotes em nódulos previamente formados (Jackson, 1985; Scott *et al.*, 1989; Pires *et al.*, 2002; Amarante & Sodek, 2006). O nitrogênio total acumulado na planta é parâmetro mais sensível ao alagamento do que o acúmulo de biomassa na parte aérea (Bacanamwo & Purcell, 1999). Plantas de soja submetidas a alagamento por 14 dias apresentaram menor acúmulo de massa seca das raízes e da parte aérea (Rosa *et al.*, 2007). Em outro estudo, foram observadas reduções de até 55% no acúmulo de massa seca da parte aérea em plantas de soja submetidas ao alagamento (Fante *et al.*, 2010).

No presente estudo, a quantidade de N acumulado na parte aérea foi avaliada em duas ocasiões, 48h após a drenagem dos tanques e durante o florescimento das plantas (Figura 5). Na primeira avaliação realizada 48h após a drenagem não houve diferença entre a condição controle (sem inundação) e a condição de excesso hídrico, também não se observou diferença entre as cultivares nesse momento. Já na avaliação realizada no florescimento, o genótipo sensível FUNDACEP 62 apresentou diminuição acentuada do N acumulado na parte aérea. O genótipo tolerante TECIRGA 6070, demonstrou estabilidade na quantidade de N na parte aérea, não diferindo entre o tratamento controle e alagado, em ambos os momentos de avaliação.

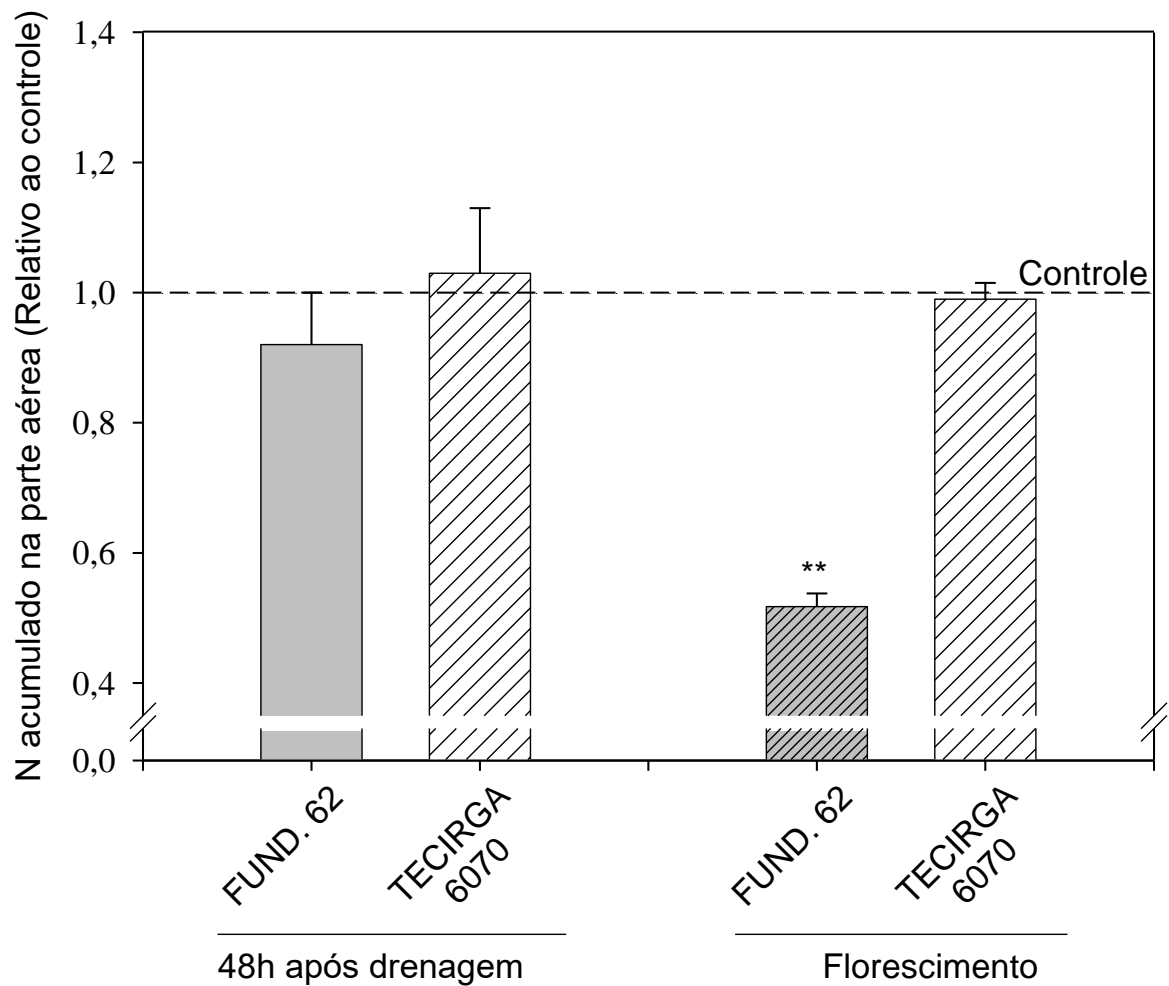


FIGURA 5. Nitrogênio (N) acumulado na parte aérea, relativo ao controle, de duas cultivares de soja em função do tratamento de excesso hídrico. Avaliações realizadas 48h após a drenagem dos tanques e durante o florescimento. ** indica diferença significativa entre as cultivares ($P < 0,01$). Porto Alegre, RS, 2014/2015.

4.3.2 Análise molecular

Foi avaliado o padrão de expressão de genes dos dois genótipos de soja contrastantes, TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, considerada tolerante (Lange *et al.*, 2013) e sensível, respectivamente, sob condições de excesso hídrico por 24h e condição controle (sem inundação). As bibliotecas de RNA-seq foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq2000. Um total de 81,76% - 82,27% dos *reads* gerados foram alinhados ao genoma de referência *Glycine max Wm82.a2.v1* (Schmutz *et al.*, 2010) (Tabela 2). A expressão de 53,2 a 53,6 mil genes foi avaliada nesta análise de RNA-seq.

Para determinar genes diferencialmente expressos em resposta ao estresse causado pelo excesso hídrico, foi aplicado teste estatístico para identificação de genes que tiveram aumento ou diminuição da expressão em comparação as plantas sob condição controle, e comparação entre os genótipos contrastante.

TABELA 2. Estatística do sequenciamento do transcriptoma.

	Genótipos	Taxa do genoma mapeado (%)	Taxa de genes mapeados (%)	Genes expressos (n°)
Excesso hídrico	TECIRGA	82.26	90.84	53585
	FUNDACEP	82.27	91.16	53226
Controle	TECIRGA	81.76	91.15	53577
	FUNDACEP	82.07	91.52	53677

Foram identificados genes com padrão de expressão alterado em função do excesso hídrico (Tabela 3). Comparando os genótipos, TECIRGA 6070 apresentou 1494 genes com aumento na expressão (*up-regulated*) e 731 genes que apresentaram diminuição da expressão (*down-regulated*) em comparação à

condição controle. Quando comparada a condição de estresse por excesso hídrico e condição controle (sem inundação) no genótipo tolerante (TECIRGA 6070), 752 e 871 genes apresentaram aumento e diminuição da expressão, respectivamente.

TABELA 3. Expressão diferencial de genes em função do excesso hídrico.

	TECIRGA vs FUNDACEP*		Inundação vs Controle	
	Inundação	Controle	TECIRGA	FUNDACEP
genes <i>up-regulated</i>	752	1494	1356	2242
genes <i>down-regulated</i>	871	731	1278	1052

*comparação entre genótipos em cada condição.

4.3.3 Análise do Transcriptograma

O transcriptograma fornece um representativo perfil global de expressão gênica, plotando valores de expressão gênica relativa sobre um ordenamento funcional de proteínas (Rybarczyk-Filho *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). Primeiramente, o transcriptograma detecta funções biológicas gerais como diferencialmente expressas, após pode-se então observar rotas metabólicas específicas e, finalmente, alguns genes podem ser apontados como responsáveis por determinada ação. A lista ordenada dos genes produzida pelo método do transcriptograma é específica para cada organismo, mas depois de organizada a lista ordenada de um dado organismo pode ser utilizada para análises de experimentos diferentes do mesmo organismo. Previamente, para *Glycine max* (soja) a lista ordenada dos genes e uma “régua” com as principais categorias de

ontologia gênica foram feitas (Apêndice 4. Artigo submetido), e podem ser utilizadas para analisar dados de transcriptoma de outros experimentos com *Glycine max*.

A “régua” utilizada para a espécie *Glycine max* apresenta os perfis de densidade do enriquecimento funcional (Figura 6). É apresentada no ordenamento uma lista com categorias de ontologia gênica, tais como ligações ao íon cálcio, ligações heme, parede celular e atividade da peroxidase (tons de roxo), produção de energia (tons de verde), seguidos por genes associados à homeostase redox celular, metabolismo de carboidratos, sinalização transmembrana (tons de vermelho), enovelamento de proteínas e resposta a estresses (tons de marrom), ciclo celular, mecanismo de reparo de DNA, ligação à cromatina e resposta a hormônios (tons de azul), tradução e expressão gênica (tons de laranja) e, finalmente à direita, ligação ao íon cobre, transporte de proteína e atividade transportadora (tons de magenta).

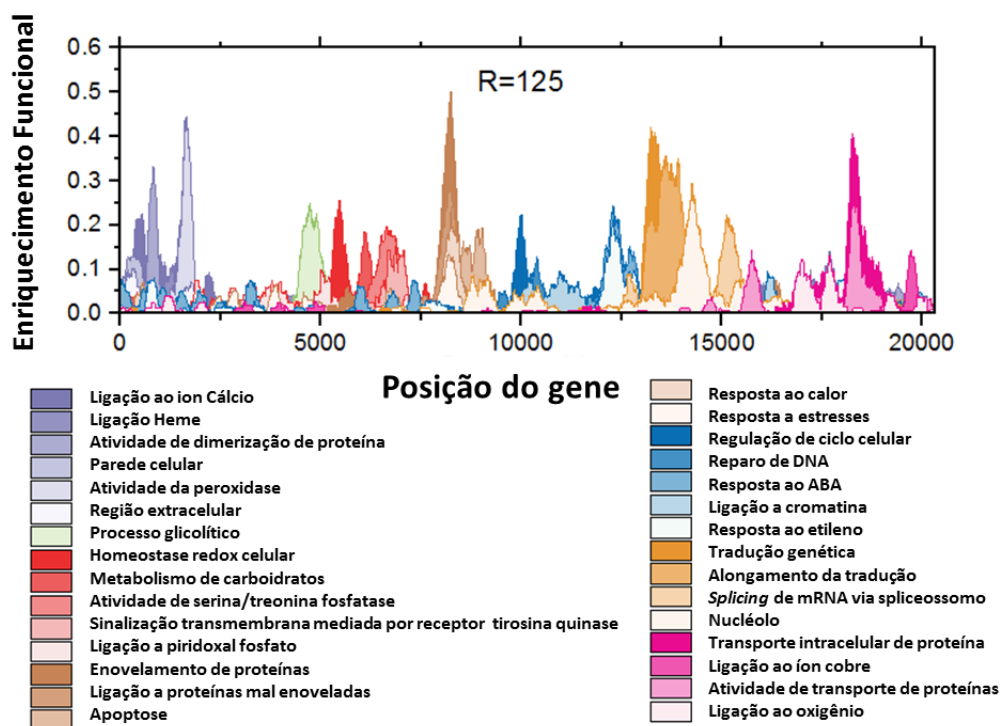


FIGURA 6. A lógica biológica da lista ordenada de genes. Da esquerda para a direita, os perfis de densidade do enriquecimento funcional indicam uma lógica biológica.

Foi então realizada a análise do transcriptograma do presente estudo, sendo utilizados os dados do RNA-seq dos dois genótipos (tolerante e sensível) e duas condições experimentais (controle e 24h de alagamento). Para comparar as diferenças entre os genótipos, foi analisado o transcriptograma com o perfil de expressão do genótipo sensível (FUNDACEP 62) em relação ao tolerante (TECIRGA 6070) na condição controle (Figura 7). Pelo perfil de expressão pode-se observar que o genótipo sensível apresenta maior expressão gênica em relação ao genótipo tolerante em diversos pontos da “régua”.

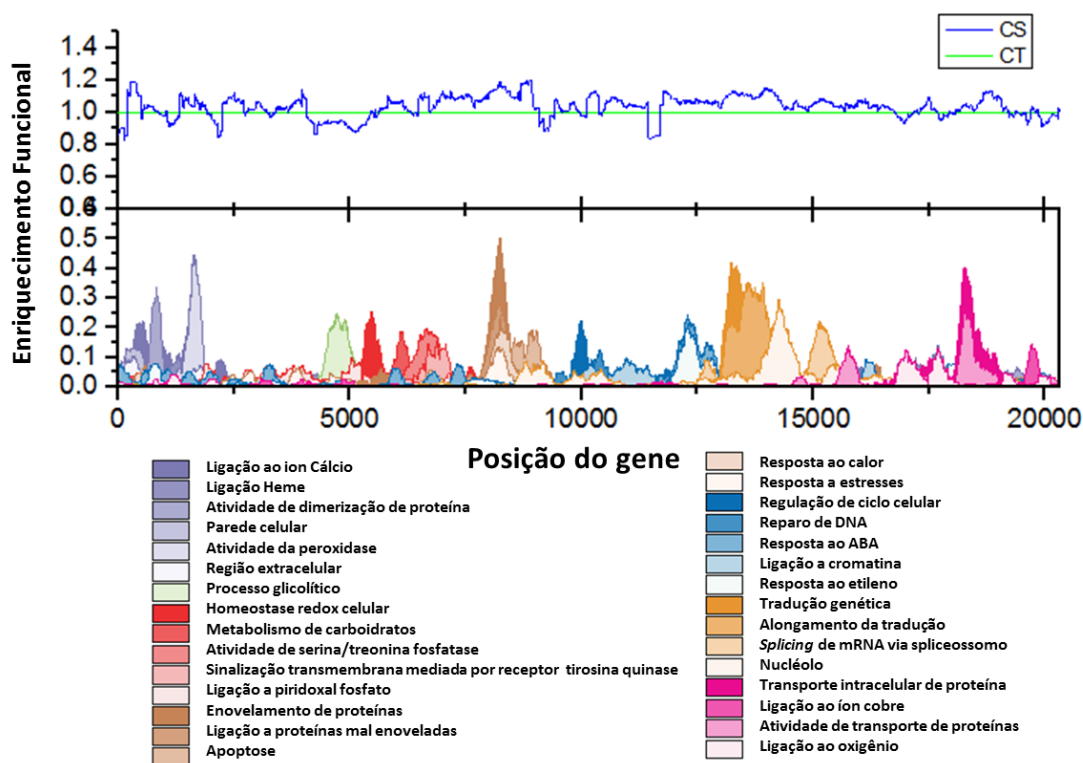


FIGURA 7. (A) Análise do transcriptograma comparando os genótipos TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, tolerante e sensível, respectivamente, na condição controle, onde a linha azul representa o perfil de expressão do genótipo sensível (CS) relativo ao genótipo tolerante (CT) representado pela linha verde. (B) Perfil de densidade de enriquecimento funcional para *Glycine max*.

Esse resultado pode ser explicado pela diferença genética entre os genótipos. Além disso, deve-se levar em consideração que as plantas foram cultivadas em Gleissolo, solo característico de áreas de terras baixas, e que os genótipos apresentam respostas diferentes quando cultivadas nesse tipo de solo (Rocha *et al.*, 2017).

Para observar como os genótipos respondem ao alongamento de maneira absoluta, foi realizada a análise do transcriptograma em relação a uma mesma amostra, no caso, relativo ao genótipo tolerante na situação controle (Figura 8). Os

perfis de expressão do genótipo sensível e do genótipo tolerante variam de maneira similar quando submetido ao excesso hídrico, apresentando o mesmo perfil de variação. Em ambos os genótipos, tolerante e sensível, pode-se observar repressão na região associada à tradução e expressão gênica (tons de laranja) em resposta ao alagamento. Nesse gráfico, podemos visualizar alguns pontos onde a resposta entre os genótipos foi diferente, na região associada a ligação a íons cálcio e ligações heme, o genótipo tolerante apresenta tendência oposta ao genótipo sensível. Na região associada a homeostase redox celular, o genótipo tolerante não altera o perfil de expressão, enquanto que, o genótipo sensível apresenta aumento de expressão nessa região. A análise desta comparação indica as regiões que devem ser analisadas com maior detalhe.

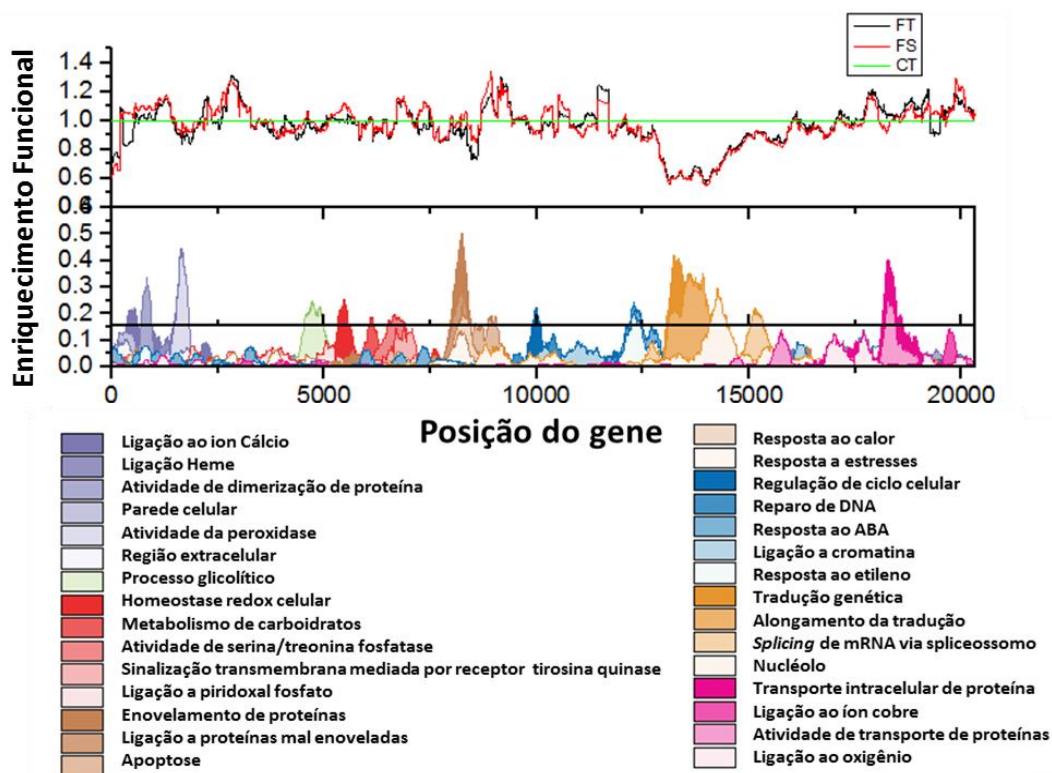


FIGURA 8. (A) Análise do transcriptograma comparando os genótipos TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, tolerante e sensível, respectivamente, na condição de alagamento, ambas as amostras relativas ao genótipo tolerante na condição controle. (B) Perfil de densidade de enriquecimento funcional para *Glycine max*.

Nesta comparação, em relação ao genes diferencialmente expressos (DEGs) em resposta ao alagamento, o genótipo tolerante apresentou 284 e 460 genes, com aumento de expressão (*up-regulated*) e diminuição da expressão (*down-regulated*), respectivamente, enquanto que o genótipo sensível apresentou 321 e 489 genes *up-regulated* e *down-regulated*, respectivamente. Na condição controle, o genótipo sensível, se comparado ao genótipo tolerante, apresentou 377 e 292 genes *up-regulated* e *down-regulated*, respectivamente (Tabela 4). Essa

diferença entre as cultivares na condição controle pode ser visualizada pela análise do transcriptograma apresentada acima (Figura 7).

TABELA 4. Genes diferencialmente expressos (DEGs) em resposta ao alagamento, comparação relativa ao genótipo tolerante na condição controle.

Genótipo	Genes “<i>up-regulated</i>”	Genes “<i>down-regulated</i>”
FUNDACEP62 (Controle)	377*	292
TECIRGA6070 (Alagamento)	284	460
FUNDACEP62 (Alagamento)	321	489

* Valores expressos em $\text{Log}_2=2$, critério utilizado foi valor mínimo 2.

Para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta ao alagamento, foi analisado o transcriptograma dos dois genótipos contrastantes, tolerante e sensível ao excesso hídrico, em comparação aos seus respectivos controles (não alagado) (Figura 9). Em resposta ao alagamento, ambos os genótipos apresentaram diminuição na expressão de genes relacionados à tradução e expressão gênica. Esta resposta indica que 24h de alagamento, a deficiência de oxigênio já pode ser percebida pelas plantas, modulando a expressão gênica. Em relação à inibição da tradução e expressão, os genótipos apresentarem o mesmo perfil de resposta, mas a repressão de genes é maior no genótipo sensível quando comparado com o genótipo tolerante na mesma condição.

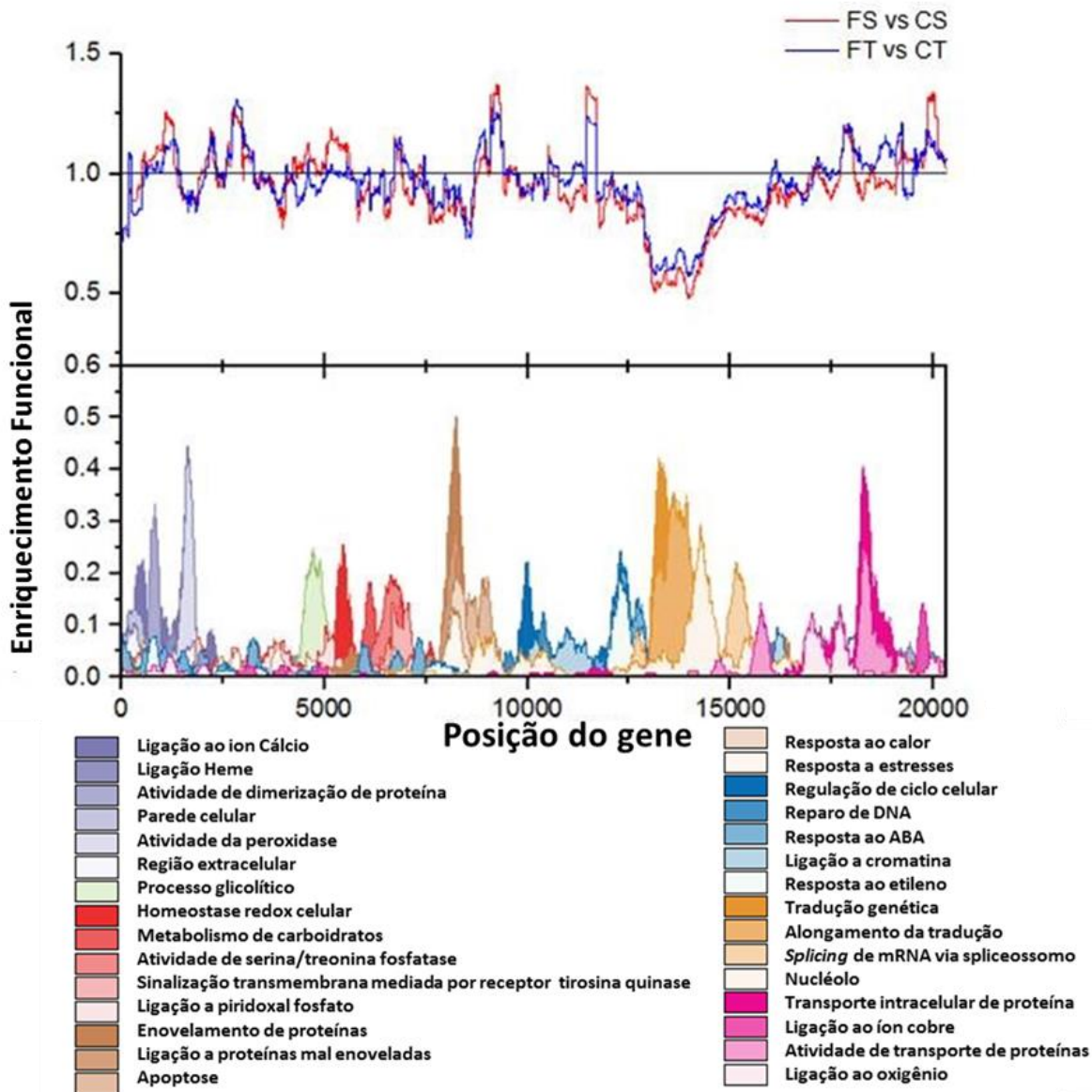


FIGURA 9. (A) Análise do transcriptograma da resposta ao alagamento nos genótipos TECIRGA 6070 e FUNDACEP 62, tolerante e sensível, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles, onde a linha azul representa o perfil de expressão do genótipo tolerante em comparação ao seu respectivo controle, a linha vermelha representa o genótipo sensível em comparação ao seu respectivo controle. (B) Perfil de densidade de enriquecimento funcional para *Glycine max*.

Na região associada à homeostase redox celular, o genótipo tolerante não altera o perfil de expressão de genes em função do alagamento se comparado ao seu respectivo controle, enquanto que, o genótipo sensível apresenta picos no perfil de expressão de genes nessa região. Esses resultados vão ao encontro dos resultados do presente estudo sobre atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), visto que o genótipo sensível (FUNDACEP 62) aumenta a atividade da enzima APX e o conteúdo de H_2O_2 em resposta ao alagamento, comparado ao seu respectivo controle. Já o genótipo tolerante (TECIRGA 6070), não aumenta a atividade da enzima APX mesmo aumentando o conteúdo de H_2O_2 em função do alagamento.

Esses resultados indicam que o controle da homeostase celular, o equilíbrio entre formação e detoxificação de espécies reativas de oxigênio está envolvido na resposta ao alagamento nos genótipos estudados. Nesse sentido, as espécies reativas de oxigênio, principalmente o H_2O_2 , tem sido relacionado à resposta ao alagamento, participando na sinalização em rotas relacionadas à resposta ao etileno, sinalização mediada por cálcio, metabolismo fermentativo e morte celular programada (Drew, 1997; Dat *et al.*, 2004; Shabala, 2011; Steffens & Sauter, 2010; Bailey-Serres & Voesenek, 2010; Licausi *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Além disso, foi realizada a análise do enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos no genótipo tolerante em resposta ao alagamento (TECIRGA 6070- 24h de alagamento). Nesta análise, foram enriquecidos termos

de ontologia gênica (GOs, do inglês “*Gene Ontology*”) e os processos biológicos predominantes foram a tradução gênica (GO:0006412), fotossíntese (GO:0015979), metabolismo de carboidratos (GO:0005975), transporte (GO:0006810), resposta a estresses (GO:0006950), transdução de sinal (GO:0007165), biossíntese (GO:0009058) e metabolismo celular (GO:0044237), apresentaram aumento de expressão em resposta ao alagamento (Figura 10).

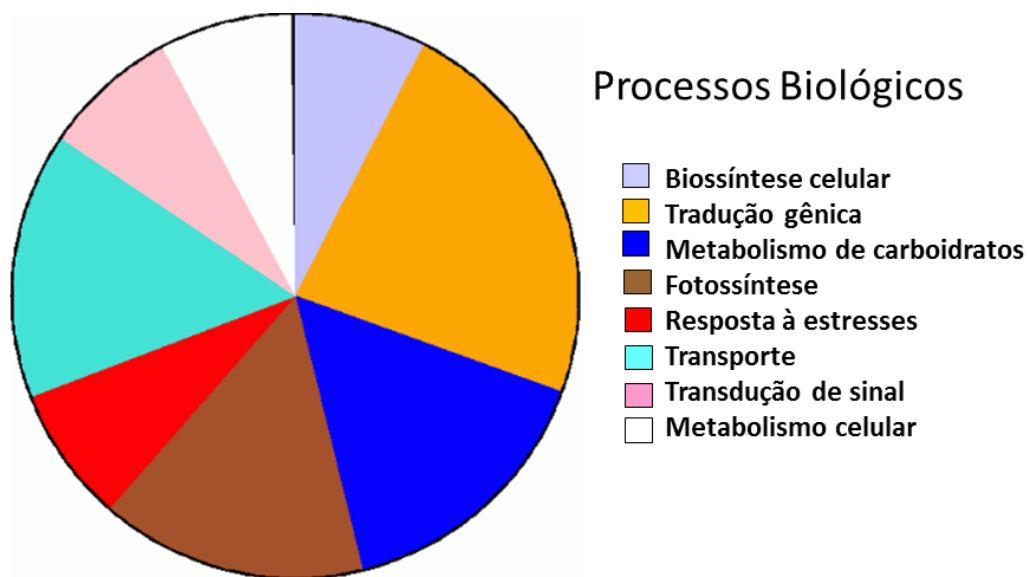


FIGURA 10. Análise do enriquecimento funcional de termos de ontologia gênica para processos biológicos, no genótipo tolerante (TECIRGA 6070) em resposta ao alagamento.

Entre os termos de ontologia gênica identificadas no genótipo tolerante estão GOs associadas à sinalização e resposta ao etileno, ligação ao íon cálcio, glicólise, metabolismo do amido, sinalização mediada por ácido jasmônico, proteínas de choque térmico, resposta ao calor e ao estresse oxidativo, homeostase redox celular, atividade da peroxidase e oxiredutase, biossíntese de

carotenoides e transdução de sinal mediada por GTPases. As GOs que são mais representadas nos genes com aumento de expressão são relacionadas à rota de sinalização mediada por etileno (GO:0009873), biossíntese de amido (GO:0019252), biossíntese de ATP (GO:0006754), transporte de elétrons do FSI (GO:0009773), biossíntese de auxina (GO:0009851) e Prolil-4-hidroxilases (GO:0018401). Em *Arabidopsis*, Prolil-4-hidroxilases é relacionada à modificação pós-transcricional de proteínas induzido pela hipóxia, desempenhando papel chave na percepção da deficiência de oxigênio (Asif *et al.*, 2009; Gorres & Raines, 2010). Em relação as GOs que apresentaram diminuição da expressão, as mais representadas estão relacionados a processos biológicos de tradução gênica (GO:0006412), fotossíntese (GO:0015979), processos metabólicos (GO:0008152), metabolismo do nitrogênio (GO:0034641), estrutura do ribossomo (GO:0003735) e processos de oxirredução (GO:0055114; GO:0016701; GO:0016491). Estes resultados vão ao encontro dos resultados encontrados em genótipos contrastantes de soja, EMBRAPA 45 e BR4, consideradas tolerante e sensível, respectivamente. Em resposta ao alagamento por 28 horas, os genótipos apresentaram indução de genes relacionados com percepção e sinalização a hipóxia e repressão de genes relacionados com processos de consumo de energia em soja (Nakayama *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado o papel do etileno na regulação das respostas das plantas ao estresse provocado pelo alagamento (Hinz *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2011; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Gasch *et al.*, 2016). Em resposta ao

alagamento, o genótipo tolerante (TECIRGA 6070) apresentou aumento da expressão de genes da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno ERFs (Glyma10g04210, Glyma19g34696, Glyma19g43815 e Glyma20g34570) e de fatores de transcrição da rota de sinalização em cascata mediada por etileno EIN3 (Glyma13g03700 e Glyma02g44220). Além disso, o genótipo tolerante apresentou aumento da expressão de calmodulina (Glyma09g40740) que atua como mensageiro secundário (Sanders *et al.*, 1999), modulando os níveis de cálcio intracelular, muitas vezes iniciando uma cascata de fosforilação de proteínas que, finalmente, tem como alvo proteínas envolvidas diretamente nos fatores de proteção celular ou de transcrição que controlam conjuntos específicos de genes regulados por estresse (Drew *et al.*, 2000; Dat *et al.*, 2004; Evans, 2004; Baxter *et al.*, 2013). Proteína de choque térmico (Glyma08g14290), chaperonas (Glyma01g37090 e Glyma08g44900) e peroxidases (Glyma06g07180, Glyma16g24640 e Glyma17g01720), que apresentam anotação funcional para resposta a estresses, também foram diferencialmente expressas em resposta ao excesso hídrico no genótipo tolerante.

Em relação ao genes que tiveram sua expressão reprimida em resposta ao alagamento, vale ressaltar a inibição de diversos genes relacionados com a fotossíntese (Glyma04g12510, Glyma05g19661, Glyma08g13360, Glyma08g18760, Glyma08g23830, Glyma09g08630), atividade da enzima rubisco (Glyma11g34230) e síntese de clorofila (Glyma12g34770, Glyma13g03430, Glyma14g00640). Esses resultados indicam que, em um primeiro momento (24

após início do alagamento), o genótipo tolerante inibe o processo fotossintético na tentativa de minimizar o estresse oxidativo. Observa-se também a inibição de enzimas de rotas fermentativas como a lactato desidrogenase (Glyma17g14950) e álcool desidrogenase (Glyma18g19050), indicando que neste caso as rotas fermentativas, não são priorizadas em resposta ao alagamento.

A tolerância ao alagamento é uma característica complexa e de caráter quantitativo, isto é, regulada por diversos genes. Nesse sentido, tanto a indução quanto a repressão de genes parecem ser importantes.

4.3.4 Identificação e validação de marcadores SNPs em genes candidatos

Foi realizada a genotipagem de 11 genótipos contrastantes com os 23 marcadores SNPs identificados em genes candidatos à tolerância ao excesso hídrico a partir do sequenciamento do RNA dos genótipos TECIRGA6070 e FUNDACEP 62 (tolerante e sensível, respectivamente). Após essa genotipagem, foram selecionados 8 marcadores SNPs que apresentaram polimorfismo comum nos genótipos tolerantes, TECIRGA 6070 e Benning. Para a validação destes marcadores foi realizada a genotipagem da população de 128 indivíduos derivada do cruzamento Benning X PI 46937, tolerante e sensível ao excesso hídrico, respectivamente. A partir de ensaios KASP, dois marcadores denominados GSM0612 e GSM0613 foram significativamente associados com escore visual de notas e taxa de sobrevivência de plantas nos anos de 2014 e 2015 (Tabela 5) (Apêndice 5) .

TABELA 5. Relação entre os marcadores SNP GSM0612 e GSM0613 e os dados de fenotipagem da população proveniente de Benning X PI 46937.

Marcador SNP	Posição do SNP *	Escore visual			Sobrevivência		
		2012	2014	2015	2012	2014	2015
					----- R ² (p - value) -----		
GSM0612	Gm03: 366065	ns	8% (P<0.003)	8% (P<0.002)	ns	12% (P<0.003)	6% (P<0.008)
GSM0613	Gm03: 366478	ns	10% P<0.001)	8% (P<0.003)	ns	15% (P<0.001)	6% (P<0.012)

* representa a coordenada do SNP no genoma de referência *Glycine max* (Wm82.a2.V1); ns= não significativo.

Ambos marcadores GSM0612 e GSM0613 estão localizados na região do éxon do gene Glyma03g004100, um proteína calmodulina (Figura 11). A calmodulina atua como mensageiro secundário, modulando os níveis de cálcio intracelular, muitas vezes iniciando uma cascata de fosforilação de proteínas que, finalmente, tem como alvo proteínas envolvidas diretamente nos fatores de proteção celular ou de transcrição que controlam conjuntos específicos de genes regulados por estresse (Sandres *et al.*, 1999; Drew *et al.*, 2000; Dat *et al.*, 2004; Evans, 2004; Baxter *et al.*, 2013).

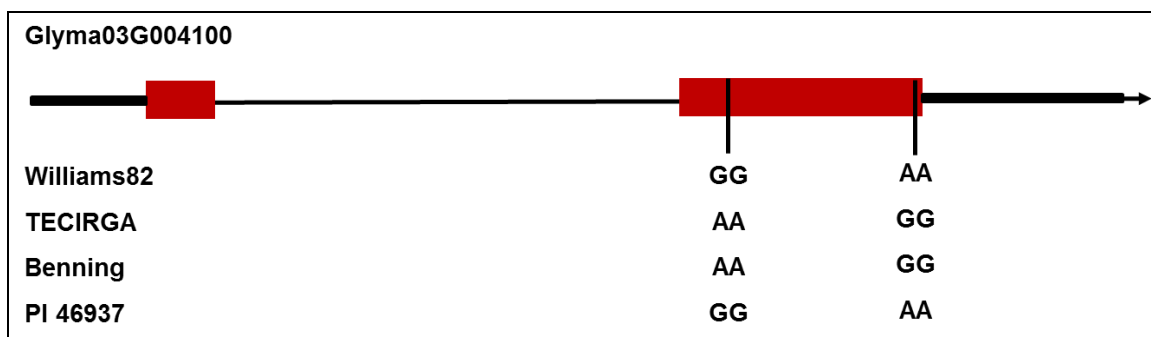


FIGURA 11. Esquema de representação gráfica mostrando a posição dos dois SNPs no gene Glyma03g004100. Regiões em vermelho representam éxons e regiões em preto representam íntrons e/ou UTRs.

Os marcadores identificados se mostraram promissores como marcadores moleculares associados ao fenótipo tolerante ao excesso hídrico na população testada. Entretanto, como a população é proveniente do cruzamento de genótipos americanos, provavelmente, por isso foram validados apenas 2 marcadores dos 23 marcadores SNPS identificados. Provavelmente, se testados em uma população proveniente do cruzamento entre TECIRGA 6070 X FUNDACEP 62 ou em um painel de genótipos brasileiros outros marcadores já identificados e desenhados podem ser validados e utilizados em programas de melhoramento genético assistido.

4.4 Conclusões

Os genótipos contrastantes avaliados neste estudo apresentam respostas fisiológicas distintas quando submetidos ao excesso hídrico. Nesse sentido, os parâmetros fisiológicos utilizados se mostram eficientes na caracterização do estresse provocado pelo excesso hídrico.

Os resultados do presente estudo em relação a atividade a enzima APX e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sugerem que no genótipo tolerante TECIRGA 6070 a produção de H_2O_2 pode estar atuando na percepção e sinalização do estresse.

Os genótipos estudados apresentam modificações no perfil da expressão de genes em resposta ao alagamento. A utilização do Transcriptograma se

mostrou uma ferramenta eficiente que fornece um representativo perfil global de expressão gênica.

Apesar da tolerância ao alagamento ser uma característica complexa e de caráter quantitativo, isto é, regulada por diversos genes, foram identificados alguns genes candidatos. Alguns genes da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno (EFRs), calmodulina e proteínas de choque térmico apresentaram aumento da expressão no genótipo tolerante em resposta ao excesso hídrico.

Os marcadores SNPs GSM0612 e GSM0613, localizados no gene Glyma03g004100, um proteína calmodulina, apresentam associação significativa com fenótipo tolerante na população derivada dos genótipos Benning X P I46937. Alguns marcadores SNPs identificados neste estudo apresentaram resultados promissores em genótipos brasileiros, necessitando ainda de futura validação.

4.5 Referências

ABDEL-HALEEM, H. *et al.* Quantitative trait loci controlling aluminum tolerance in soybean: candidate gene and single nucleotide polymorphism marker discovery. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 33, p. 851-862, 2014.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

ALMEIDA, R. M. C. *et al.* Transcriptome analysis reveals manifold mechanisms of cyst development in ADPKD. **Human Genomics**, London, v. 10, [art.] 37, [p. 1-24], 2016.

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

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

ASIF, M. H. *et al.* Prolyl-4-hydroxylase (*AtP4H1*) mediates and mimics low oxygen response in *Arabidopsis thaliana*. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 9, p. 525-535, 2009.

BACANAMWO, M.; PURCELL, L. C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources, and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 334, p. 689-696, 1999.

BAILEY-SERRES, J.; CHANG, R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 507-518, 2005.

BAILEY-SERRES, J.; LEE, S. C.; BRINTON, E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, n. 4, p. 1698-1709, 2012.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, 2008.

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

BAILEY-SERRES, J. *et al.* Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.

BAXTER, A. *et al.* ROS as players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 1229-1240, 2013.

BAXTER-BURRELL, A. *et al.* Gene and enhancer trap transposable elements reveal oxygen deprivation-regulated genes and their complex patterns of expression in *Arabidopsis*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 129-141, 2003.

BORU, G. *et al.* Responses of soybean to oxygen deficiency and elevated root-zone carbon dioxide concentration. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 447-453, 2003.

BUI, L. T. *et al.* Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 236, p. 37-43, 2015.

BRITTO, D. T. *et al.* Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 98, n. 7, p. 4255-4258, 2001.

CAUDLE, K. L.; MARICLE, B. R. Effects of flooding on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and oxygen stress in plants of varying flooding tolerance. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, Topeka, v. 115, n. 1/2, p. 5-18, 2012.

CHEN, W. *et al.* Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, [art.] 1044, [p. 1-19], 2016.

CHILDS, S. P. *et al.* Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 131, p. 27-41, 2018.

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

CHO, W.; YAMAKAWA, T. Effects on growth and seed yield of small seed soybean cultivars of flooding conditions in paddy field. **Journal of Faculty of Agriculture**, Fukuoka, v. 51, n. 2, p. 189-193, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2017/2018: décimo primeiro levantamento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos**, Brasília, DF, v. 5, n. 11, p. 102-108, ago. 2018. Monitoramento agrícola. Projeto Observatório Agrícola.

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: Evangraf, 1996. 233 p.

DAT, J. F. *et al.* Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 4, p. 273-282, 2004.

DE LORENZO, L. *et al.* Noncanonical alternative polyadenylation contributes to gene regulation in response to hypoxia. **The Plant Cell**, Rockville, v. 29, n. 6, p. 1262-1277, 2017.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 223-250, 1997.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 3, p. 123-127, 2000.

DESHMUKH, R. *et al.* Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, [art.] 244, [p. 1-12], 2014.

ELSE, M. A. *et al.* Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 313-323, 2009.

EVANS, E. D. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, n. 1, p. 35-49, 2004.

FANTE, C. A. *et al.* Respostas fisiológicas em cultivares de soja submetidas ao alagamento em diferentes estádios. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 253-261, 2010.

FARNESE, F. S. *et al.* When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant response to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, [art.] 471, [p. 1-15], 2016.

FEHR, W.; CAVINESS, R. H. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill. **Plant Science for a Better World**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1977.

FIELD, C. B. **Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation**: special report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. 582 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; ONU. **Statistical yearbook 2015**: world food and agriculture. Rome: FAO, 2015. 236 p.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 9, p. 449-456, 2004.

GANAL, M. W.; ALTMANN, T.; RODER, M. S. SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 2, p. 211-217, 2009.

GASCH, P. *et al.* Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 28, n. 1, p. 160-180, 2016.

GAUT, B. S.; CLEGG, M. T. Nucleotide polymorphism in the *Adh1* locus of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae). **Genetics**, Oxford, v. 135, n. 4, p. 1091-1097, 1993.

GIBBERD, M. R. *et al.* Waterlogging tolerance among a diverse range of Trifolium accessions is related to root porosity lateral root formation and aerotropic rooting. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 579-589, 2001.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, n. 1, p. 1-47, 2003.

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

GITHIRI, S. M. *et al.* QTL analysis of flooding tolerance in soybean at an early vegetative growth stage. **Plant Breeding**, Berlin, v. 125, n. 6, p. 613-618, 2006.

GORRES, K. L.; RAINES, R. T. Prolyl 4-hydroxylase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 45, n. 2, p. 106-124, 2010.

GONZALI, S. *et al.* Universal stress protein *HRU1* mediates ROS homeostasis under anoxia. **Nature Plants**, London, v. 1, n. 11, [art.] 15151, [p. 1-9], 2015.

GRACIET, E.; WELLMER, F. The plant N-end rule pathway: structure and functions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, n. 8, p. 447-453, 2010.

HASHIGUCHI, A.; KOMATSU, S. Posttranslational modifications and plant–environment interaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 586, p. 97-113, 2017.

HASHIGUCHI, A.; KOMATSU, S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress. **Proteomes**, Berlin, v. 4, n. 42, [p. 1-14], 2016.

HATTORI, Y. *et al.* The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. **Nature**, London, v. 460, n. 7258, p. 1026-1030, 2009.

HEBELSTRUP, K. H. *et al.* Hemoglobin modulates NO emission and hyponasty under hypoxia-related stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5581-5591, 2012.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 495-503, 1990.

HESS, N. *et al.* The hypoxia responsive transcription factor genes *ERF71/HRE2* and *ERF73/HRE1* of *Arabidopsis* are differentially regulated by ethylene. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 143, n. 1, p. 41-49, 2011.

HINZ, M. *et al.* *Arabidopsis* RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 757-772, 2010.

HIRABAYASHI, Y. *et al.* Global flood risk under climate change. **Nature Climate Change**, London, v. 3, n. 9, p. 816-821, 2013.

HOU, F. F.; THSENG, F. S. Studies on the flooding tolerance of soybean seed: varietal differences. **Euphytica**, Dordrecht, v. 57, n. 2, p. 169-173, 1991.

JACKSON, M. B.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 1, n. 3, p. 274-287, 1999.

JACKSON, M. B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 145-174, 1985.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 501-505, 2005.

JUSTINO, G. C.; SODEK, L. Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulated root system of soybean. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 3, p. 235-241, 2013.

KHATOON, A. *et al.* Analysis of response mechanism in soybean under low oxygen and flooding stresses using gel-base proteomics technique. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 12, p. 10581-10594, 2012.

KOMATSU, S. *et al.* A Comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 8, n. 10, p. 4766-4778, 2009.

KOMATSU, S.; SAKATA, K.; NANJO, Y. 'Omics' techniques and their use to identify how soybean responds to flooding. **Journal of Analytical Science and Technology**, Daejeon, v. 6, [art.] 9, [p. 1-8], 2015.

KOMATSU, S.; HASHIGUCHI, A. Subcellular proteomics: application to elucidation of flooding-response mechanisms in soybean. **Proteomes**, Berlin, v. 6, n. 1, [art.] 13, [p. 1-15], 2018.

LANGE, C. E. *et al.* Nova cultivar de soja TECIRGA 6070 RR desenvolvida para o cultivo em solos arroseiros gaúchos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 8., 2013, Santa Maria. **Anais [...]**. Santa Maria: UFSM, 2013. p. 196-199.

LEVIN, J. Z. *et al.* Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 9, p. 709-715, 2010.

LICAUSI, F. *et al.* *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 302-315, 2010.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH, N. P. Microbiology of flooded rice paddies. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 625-645, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. R. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2^{-ΔΔct} method. **Methods**, Irvine, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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

MALIK, V. S. RNA sequencing as a tool for understanding biological complexity of abiotic stress in plants. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 25, n. 1, p. 1-2, 2016.

MAMMADOV, J. *et al.* SNP markers and their impact on plant breeding. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2012, [art.] 728398, [p. 1-11], 2012.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, San Diego, v. 92, n. 5, p. 255-264, 2008.

MUTAVA, R. N. *et al.* Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 86, p. 109-120, 2015.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, v. 89, p. 4.11.1-4.11.13, 2010.

NAGALAKSHMI, U. *et al.* The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, New York, v. 320, n. 5881, p. 1344-1349, 2008.

NAKAYAMA, T. J. *et al.* Insights into soybean transcriptome reconfiguration under hypoxic stress: functional, regulatory, structural, and compositional characterization. **PLOS One**, San Francisco, v. 12, n. 11, [art.] e0187920, [p. 1-20], 2017.

NANJO, Y. *et al.* Transcriptional responses to flooding stress in roots including hypocotyl of soybean seedlings. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 77, p. 129-144, 2011.

NAVROT, N. *et al.* Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 129, n. 1, p. 185-195, 2007.

OOSTERHUIS, D. M. *et al.* Physiological responses of two soybean [*Glycine max* (L.) Merr] cultivars to short-term flooding. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 85-92, 1990.

PAULETO, E. A.; SOUZA, R. O.; GOMES, A. S. Caracterização e manejo de solos de várzea cultivados com arroz irrigado. *In*: PESKE, S. T. *et al.* **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: UFPel, 1998. p. 67-98.

PATIL, G. *et al.* Genomic-assisted haplotype analysis and the development of high-throughput SNP markers for salinity tolerance in soybean. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 19199, [p. 1-13], 2016.

PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Morphophysiological changes of soybean in flooded soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 41-50, 2002.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 94-100, 2002.

REENA, N. *et al.* Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. **New Phytologist**, Oxford, v. 190, n. 2, p. 472-487, 2011.

RHINE, M. D. *et al.* Yield and nutritional responses to waterlogging of soybean cultivars. **Irrigation Science**, Heidelberg, v. 28, p. 135-142, 2010.

ROCHA, T. S. M. D. *et al.* Performance of soybean in hydromorphic and nonhydromorphic soil under irrigated or rainfed conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 52, p. 293-302, 2017.

ROSA, G. F. *et al.* Acúmulo de massa seca em genótipos de soja fixando N₂ simbioticamente sob influência do alagamento. *In*: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2007, Pelotas. **Anais** [...]. Pelotas: UFPel, 2007. p. 398.

RUSSELL, D. A.; WONG, D. M. L.; SACHS, M. M. The anaerobic response of soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 2, p. 401-407, 1990.

RYBARCZYK-FILHO, J. L. *et al.* Towards a genome-wide transcriptogram: the *Saccharomyces cerevisiae* case. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, n. 8, p. 3005-3016, 2011.

SHABALA, S. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. **New Phytologist**, Oxford, v. 190, n. 2, p. 289-298, 2011.

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

SACHS, M. M.; SUBBAIAH, C. C.; SAAB, I. N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 294, p. 1-15, 1996.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Communicating with calcium. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 691-706, 1999.

SASIDHARAN, R.; MUSTROPH, A. Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 12, p. 4173-4183, 2011.

- SCHMUTZ, J. *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, London, v. 463, n. 7278, p. 178-183, 2010.
- SCHOFFEL, E. R. *et al.* Excesso hídrico sobre os componentes do rendimento da cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 7-12, 2001.
- SCOTT, H.D. *et al.* Flood duration effects on soybean growth and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 4, p. 631-636, 1989.
- SEMAGN, K. *et al.* Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 33, p. 1-14, 2014.
- SHI, Z. *et al.* SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, London, v. 16, [art.] 314, [p. 1-12], 2015.
- SILVA, S. R. M. *et al.* Reproducibility enhancement and differential expression of non-predefined functional gene sets in human genome. **BMC Genomics**, London, v. 15, [art.] 1181, [p. 1-18], 2014.
- STEFFENS, B.; SAUTER, M. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 4, p. 375-378, 2010.
- SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1747-1762, 1994.
- SUZUKI, N. *et al.* Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 6, p. 691-699, 2011.
- TAMANG, B. G. *et al.* Physiological and transcriptomic characterization of submergence and reoxygenation responses in soybean seedlings. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 2350-2365, 2014.
- TEDESCO, J. M. *et al.* **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.
- THOMAS, A. L. **Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O₂**. 2004. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

THOMAS, A. L.; GUERREIRO, S. M. C.; SODEK, L. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 1191-1198, 2005.

VALLIYODAN, B. *et al.* Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 8, p. 1835-1849, 2017.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, [p. 1-12], 2002.

VANTOAI, T. T. *et al.* Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 1112-1115, 1994.

VIDAL, R. O. *et al.* Identification of SNPs in RNA-seq data of two cultivars of *Glycine max* (soybean) differing in drought resistance. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 331-334, 2012.

VOESENEK, L. A. C. J. *et al.* Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. **Ecology**, Washington, DC, v. 85, n. 1, p. 16-27, 2004.

VOESENEK, L. *et al.* How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, Oxford, v. 170, n. 2, p. 213-226, 2006.

VOESENEK, L.; BAILEY-SERRES, J. Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 16, n. 5, p. 647-653, 2013.

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

WANG, W. X.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews - Genetics**, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WANG, X.; KOMATSU, S. Proteomic approaches to uncover the flooding and drought stress response mechanisms in soybean. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 172, p. 201-215, 2018.

WANG, X.; SAKATA, K.; KOMATSU, S. An integrated approach of proteomics and computational genetic modification effectiveness analysis to uncover the mechanisms of flood tolerance in soybeans. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 5, [art.] 1301, [p. 1-22], 2018.

XU, K.; MACKILL, D. J. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 219-224, 1996.

XU, K. *et al.* *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, London, v. 442, n. 7103, p. 705-708, 2006.

YAMADA, K. *et al.* Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, Washington, DC, v. 302, n. 5646, p. 842-846, 2003.

YIN, X. J.; KOMATSU, S. Comprehensive analysis of response and tolerant mechanisms in early-stage soybean at initial-flooding stress. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 169, p. 225-232, 2017.

ZANON, A. J. *et al.* Desenvolvimento de cultivares de soja em função do grupo de maturação e tipo de crescimento em terras altas e terras baixas. **Bragantia**, Campinas, v. 74, p. 400-411, 2015.

ZANON, A. J.; STRECK, N. A.; GRASSINI, P. Climate and management factors influence soybean yield potential in a subtropical environment. **Agronomy Journal**, Madison, v. 108, n. 4, p. 1447-1454, 2016.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O estresse causado pelo excesso hídrico afeta a eficiência fotossintética, o acúmulo de massa seca, rendimento de grãos e sobrevivência de plantas dos genótipos de soja avaliados no presente estudo. Neste estudo, o genótipo PONTA apresenta maior rendimento quântico da fotossíntese em comparação aos demais genótipos em resposta ao excesso hídrico por 4 dias, bem como melhor recuperação após a drenagem avaliada pelo Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) e pelo maior acúmulo de massa seca da parte aérea.

Em relação a sobrevivência de plantas, os genótipos TECIRGA6070 e PONTA apresentam maior sobrevivência quando comparadas aos demais genótipos avaliados após 4 dias sob excesso hídrico.

Outro parâmetro que apresenta diferença significativa entre os genótipos avaliados é o rendimento de grãos. Os genótipos TECIRGA 6070, PONTA e VALENTE apresentam maior rendimento de grãos em resposta ao alagamento quando comparados aos demais genótipos. Já o genótipo SYN1359 (considerada sensível ao excesso hídrico) apresenta menor rendimento de grãos em resposta ao estresse provocado pelo excesso hídrico.

Os genótipos contrastantes avaliados neste estudo apresentam respostas fisiológicas distintas quando submetidos ao excesso hídrico. Nesse sentido, os parâmetros fisiológicos utilizados se mostram eficientes na caracterização do estresse provocado pelo excesso hídrico.

Os resultados do presente estudo em relação a atividade a enzima APX e conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sugerem que no genótipo tolerante TECIRGA 6070 a produção de H_2O_2 pode estar atuando na percepção e sinalização do estresse.

Os genótipos estudados apresentam modificações no perfil da expressão de genes em resposta ao alagamento. A utilização do Transcriptograma se mostrou uma ferramenta eficiente que fornece um representativo perfil global de expressão gênica.

Apesar da tolerância ao alagamento ser uma característica complexa e de caráter quantitativo, isto é, regulada por diversos genes, foram identificados alguns genes candidatos. Alguns genes da família de fatores de transcrição responsivos ao etileno (EFRs), calmodulina e proteínas de choque térmico apresentaram aumento da expressão no genótipo tolerante em resposta ao excesso hídrico.

Os marcadores SNPs GSM0612 e GSM0613, localizados no gene Glyma03g004100, um proteína calmodulina, apresentam associação significativa com fenótipo tolerante na população derivada dos genótipos Benning X P I46937. Alguns marcadores SNPs identificados neste estudo apresentaram resultados promissores em genótipos brasileiros, necessitando ainda de futura validação.