



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

Análise transcricional de genes relacionados ao déficit hídrico e teor de óleo em soja  
(*Glycine max*)

**Aluno:** Adriano Sérgio B. Queiroz

PALMAS- TO

2019

ADRIANO SÉRGIO BERNARDO QUEIROZ

Análise transcricional de genes relacionados ao déficit hídrico e teor de óleo em soja  
(*Glycine max*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Agroenergia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Solange Aparecida Ságio

**Coorientador:** Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto

PALMAS- TO

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

Q3a Queiroz, Adriano Sérgio Bernardo.

Análise transcricional de genes relacionados ao déficit hídrico e teor de óleo em soja (*Glycine max*). / Adriano Sérgio Bernardo Queiroz. – Palmas, TO, 2019.

48 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2019.

Orientadora : Solange Aparecida Ságio

Coorientador: Horllys Gomes Barreto

1. Fator de transcrição. 2. Estresse Abiótico. 3. Expressão Gênica. 4. Biocombustíveis. I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

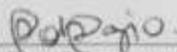
ADRIANO SÉRGIO BERNARDO QUEIROZ

Análise transcricional de genes relacionados ao déficit hídrico e teor de óleo em soja  
(*Glycine max*)

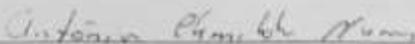
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia avaliado para a obtenção do título de Mestre em Agroenergia, e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca examinadora.

Data de Aprovação 12 / 04 / 2019

Banca examinadora:



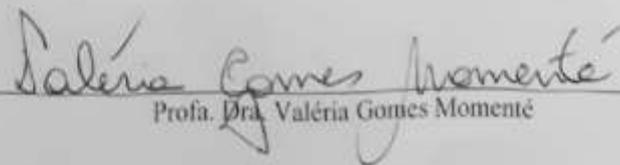
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Solange Aparecida Ságio (Presidente)



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Antônia Clemilda Nunes



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Valéria Gomes Momenté

Dedico este trabalho à minha esposa, que esteve comigo todo tempo. Apoiou-me, chorou, alegrou-se e acreditou desde o início que eu conseguiria conquistar este título. À minha família, pelo apoio e orações. Aos meus amigos, pela força.

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, a Deus pelas oportunidades que me foram dadas durante todo o mestrado e por sua infinita misericórdia em minha vida; devo-lhe tudo, ó Senhor de minha vida, Jesus Cristo.*

*À minha esposa por ter acreditado, apoiado, incentivado, investido neste sonho de ser mestre e ter vivenciado momentos tristes e alegres nestes dois anos, sempre estando ao meu lado.*

*Ao meu pai José Carlos, à minha mãe Alicione, minha irmã Aline e minha tia Leonice por terem apoiado, orado e acreditado que eu conquistaria o título de mestre;*

*Ao meu irmão Sérgio Carlos pela inspiração e força desde o início de minha vida acadêmica.*

*Aos meus amigos, Gabriel e Aline, Rennan e Ludmila, Tito e Flávia, que estiveram orando e apoiando, em todo os momentos, para que esta conquista fosse realizada em minha vida.*

*À minha orientadora Solange Sággio pelo carinho, disposição e paciência por me orientar nestes dois anos. Minha profunda gratidão por tudo que adquiri nesta caminhada.*

*Ao professor Horllys Barreto pela atenção, paciência e disposição em me guiar com muita sabedoria durante a execução deste projeto.*

*À Clemilda Nunes pela atenção, disponibilidade e contribuição para a realização deste projeto.*

*À equipe (amigos) do Laboratório de Saúde Humana, em especial, ao Matheus pela extrema paciência a me ensinar e ajudar na execução deste projeto no laboratório.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio concedido durante o programa de mestrado.*

## RESUMO

A demanda por fontes renováveis de combustíveis vem crescendo, assim como a necessidade de encontrar alternativas para aumentar a sua produção de matéria-prima. Óleos vegetais têm sido destinados a diferentes aplicações, não só na área de biocombustíveis, mas também na indústria; programas de melhoramento de soja têm-se concentrado no desenvolvimento de variedades mais produtivas. Diante disso, alguns fatores podem influenciar na composição química das sementes, como fatores genéticos e ambientais, sendo fatores determinantes de qualidade da soja. Uma característica relacionada ao fator ambiental que tem ganhado grande destaque, nos últimos anos é o déficit, que pode afetar atividades de algumas enzimas, provocar o acúmulo de proteínas e solutos compatíveis, açúcares, aminoácidos e alterar o metabolismo dos lipídios que auxiliam na síntese da membrana. Eventos moleculares são iniciados pela percepção do estresse hídrico, a qual envolve uma grande rede genética e complexa de mecanismos moleculares. Estudos, nas últimas décadas, já identificaram muitos genes relacionados ao estresse hídrico em plantas, sendo que um desses estudos evidenciou que a proteína de ligação a elementos responsivos à desidratação (*DREB*) desempenha um papel importante na resposta ao estresse abiótico. À vista disso, este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes relacionados ao déficit hídrico e teor óleo na cultura da soja. Para a análise da expressão gênica em PCR em tempo real, foram utilizadas folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), da cultivar M9144 RR, na qual os tratamentos estavam divididos da seguinte forma: 25V25R - a cultura sofreu déficit hídrico, durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ET<sub>pc</sub>: 100V100R – tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ET<sub>pc</sub> durante todo o ciclo. A quantificação da expressão relativa dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5* mostrou que o estresse hídrico sofrido pela cultivar, durante todo o ciclo, teve maior expressão no estágio reprodutivo; já o gene *DGAT3A* não teve diferença de expressão para ambos os tratamentos.

**Palavras-Chave:** Fator de transcrição. Estresse Abiótico. Expressão Gênica. Biocombustíveis.

## ABSTRACT

The demand for renewable sources of fuel has been growing, as well as the need to find alternatives to increase the production of raw materials. Vegetable oils have been intended for different applications not only in the area of biofuels, but also in industry. Soybean breeding programs have been focused on the development of more productive varieties, and some factors may influence the chemical composition of the seeds, such as genetic and environmental factors, being determinants of soybean quality. A characteristic related to the environmental factor that has gained great prominence in the last years is the water deficit that can affect the activities of some enzymes, causes the accumulation of compatible proteins and solutes, sugars, amino acids and changes the metabolism of the lipids that aid in the synthesis of the membrane. Molecular events are initiated by the perception of water stress, a perception that involves a large genetic network and complex molecular mechanisms. Studies in the last decades have identified many genes related to water stress in plants, one of these studies has shown that the dehydration-responsive element binding protein (DREB) plays an important role in the response to abiotic stress. In order to analyze gene expression in real-time PCR, soybean leaves (*Glycine max* (L.) Merrill) were used to analyze the expression of genes related to water deficit and oil content in the soybean crop. of the cultivar M9144 RR in which the treatments were divided as follows: 25V25R - the crop suffered a water deficit during the whole cycle, being irrigated with 25% of the ET<sub>pc</sub>: 100V100R - treatment in which the plants did not suffer water deficit, being irrigated with 100% of the ET<sub>pc</sub> throughout the cycle. The quantification of the relative expression of the GmDREB1 and GmDREB5 genes showed that the water stress experienced by the cultivar during the whole cycle had greater expression at the reproductive stage, since the DGAT3A gene had no difference in expression for both treatments.

**Keywords:** Transcription factor. Abiotic stress. Gene expression. Biofuels

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CO <sub>2</sub>	Gás Carbono
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
FTs	Fator de Transcrição
TAGs	Triacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol O-aciltransferase
ET <sub>pc</sub>	Evapotranspiração potencial da cultura
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
M	Monsoy <sup>®</sup>
RR	Roundup Ready <sup>®</sup>
DREB	<i>Dehydration Responsive Element Binding protein</i> (Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação)
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative PCR
NAC	No apical meristem
ATAF	Arabidopsis transcription activation factor
CUC	Cup- shaped cotyledon
MYB	Myeloblastosis

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers dos genes estudados.....	30
---	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema ilustrando as rotas ABA dependente e independente em resposta aos estresses abióticos como seca, alta salinidade e frio. Os fatores de transcrição responsáveis pela indução dos genes de resposta aos estresses e respectivos elementos cis-atuantes e exemplos de genes-alvo estão ilustrados. .... 27
- Figura 2 -** Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes GmDREB1 e GmDREB5 em soja no estágio vegetativo (V4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. A - Expressão quantitativa dos genes GmDREB1 e GmDREB5. B - Ilustração do estágio V4 da cultura da soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (GmB-Actin e FYVE). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ETpc; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ETpc. .... 32
- Figura 3 -** Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes GmDREB1 e GmDREB5 em soja no estágio reprodutivo (R4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. A Expressão quantitativa dos genes GmDREB1 e GmDREB5. B Ilustração do estágio R4 da cultura da soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (GmB-Actin e FYVE). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ETpc; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ETpc. .... 35
- Figura 4 -** Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR do DGAT3A em soja no estágio vegetativo (V4) e reprodutivo (R4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (GmB-Actin e FYVE). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ETpc; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ETpc. .... 38

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Soja – Cultura Agroenergética.....	16
3.2 Biodiesel, teor de óleo .....	17
3.3 Biossíntese de ácidos graxos e gene DGAT .....	18
3.4 Fatores Ambientais .....	20
3.5 Déficit Hídrico .....	22
3.6 Genes relacionados ao déficit hídrico.....	24
3.6.1 Família do gene <i>DREB</i> .....	25
3.7 Ferramentas biotecnológicas.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Material vegetal .....	29
4.2 Seleção de genes.....	29
4.3 Extração de RNA total e Síntese de cDNA .....	30
4.4 Expressão Gênica .....	30
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	31
5.1 Análise Transcricional no Estádio Vegetativo (V4) .....	31
5.2 Análise Transcricional no Estádio Reprodutivo (R4).....	34
5.4 Análise Transcricional no Estádio Vegetativo (V4) e Reprodutivo (R4) do gene <i>DGAT3A</i> .....	37
6. CONCLUSÃO .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## 1. INTRODUÇÃO

A dependência do petróleo e a poluição gerada pelo óleo diesel são grandes problemas que o mundo vem enfrentando, nas últimas décadas, o que tem estimulado a busca por fontes energéticas renováveis. Alguns acontecimentos evidenciaram a necessidade da busca por fontes renováveis, como as crises do petróleo das décadas de 70 e 80 do século XX. Dados sobre as alterações climáticas decorrentes das emissões de gases estufa e seus impactos ambientais são fatores determinantes para a intensificação do desenvolvimento de fontes renováveis de energia, buscando, assim, matérias-primas de menor custo (FÁTIMA et al., 2010).

Com essa busca por fontes energéticas renováveis, a cultura da soja vem ganhando destaque, mundialmente e a produção de biodiesel vem tendo como principal matéria-prima o óleo de soja, ocupando hoje o segundo maior mercado de óleos vegetais no mundo, com 30% da produção mundial. Já no Brasil, essa representação do óleo de soja foi 70,75% de todo o biodiesel produzido no país. Produtividade e rentabilidade vêm fazendo com que a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) seja, hoje, a principal fonte de óleo para a produção de biodiesel e de proteína como alimentação animal, sendo ambos condicionados por fatores genéticos e ambientais (MME, 2017; NAOE et al., 2018).

De acordo com o último levantamento da CONAB (safra 2018/2019), a cultura da soja teve um crescimento de 1,9 % em área plantada, em relação ao ano anterior, sendo um dos principais produtos na balança comercial brasileira. Amplamente difundida por suas variadas formas de utilização, em diferentes segmentos, a soja é utilizada, para a produção de farelo utilizado na suplementação animal, na alimentação humana e, também, como fonte na produção de biocombustíveis, consolidando uma cadeia agroindustrial e reafirmando, assim, seu papel fundamental para a economia brasileira (CONAB, 2019).

Os programas de melhoramento de soja têm-se concentrado no desenvolvimento de variedades mais produtivas. Entretanto, mais recentemente, há também uma preocupação com características de qualidade, tais como conteúdo e composição do óleo e da proteína de reserva. Para isso, os pesquisadores têm recorrido ao germoplasma, tanto ao adaptado como ao silvestre, em busca de variabilidade genética. Assim, com o intuito de se ganhar tempo, trabalhos de

pesquisa têm sido realizados visando avaliar a capacidade de produção de óleo e proteína das cultivares comerciais (BARBOSA et al., 2011).

Verifica-se que fatores genéticos e ambientais afetam a composição química das sementes, como os conteúdos de proteína e óleo no grão, que são compostos determinantes da qualidade da soja. Cultivares de soja podem sofrer influência pela mudança do ambiente, afetando, assim, a produtividade de óleo. Alguns autores enfatizam que o déficit hídrico é um dos principais fatores ambientais que limitam o crescimento, levando a planta a uma diminuição considerável na produção, mesmo em cultivares com excelente potencial genético (MONTEIRO et al., 2017; NUNES, 2015).

Estresses abióticos, como déficit hídrico, podem limitar o crescimento e rendimento de espécies economicamente importantes. Investigações sobre processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares relacionados ao déficit hídrico têm desvendado mecanismos de como as plantas detectam o déficit hídrico e processam essas informações para alterar a expressão gênica. Foi identificada, em *Arabidopsis thaliana*, uma família multigênica de fatores de transcrição, conhecida como *DREB* (*Dehydration Responsive Element Binding protein* - Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação) e, ou, também, como CBF (*C-repeat-binding Jactor* - fator de ligação a repetições C) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Fatores de transcrição *DREB* estão no topo da cascata de eventos moleculares que finalizam com respostas à defesa contra a desidratação celular. Apesar de se ter conhecimento sobre os processos de desidratação celular vegetal, em soja, ainda, não se tem a compreensão de como essa rede complexa de processos moleculares, em resposta à seca, são administrados pela planta, tornando-se um grande obstáculo para a melhoria na produção de óleo na cultura (NEPOMUCENO et al., 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Analisar o perfil de expressão dos genes *GmDREB1*, *GmDREB5* e *DGAT3A*, por meio da técnica de PCR em tempo real, em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão diferencial (RT-qPCR) do gene que codifica a enzima Acyl Coa:diacylglicerol acyltransferase (*DGAT3A*) em folhas de soja.
- Analisar a expressão diferencial (RT-qPCR) dos genes *GmDREB1* e *GmDREB 5* em folhas de soja submetidas ao déficit hídrico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Soja – Cultura Agroenergética

O Brasil é o segundo maior produtor mundial e, dentre os grandes produtores, é o que possui o maior potencial de expansão em área cultivada, podendo, se depender das necessidades de consumo do mercado, mais do que duplicar a produção (VANDOIR, 2017).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) se tornou uma das mais importantes culturas, para a economia mundial, destacando-se como a cultura oleaginosa mais cultivada no mundo. Foi responsável pela expansão da fronteira agrícola no Brasil, principalmente, nas regiões sob vegetação de cerrado. Contudo a implantação dessa cultura, em novas áreas de cultivo, tem exigido novas tecnologias e manejo cultural adequado (PETTER et al., 2014).

A safra 2018/19 está estimada em 35.818,8 mil hectares. A perspectiva é de aumento de 1,9%, em relação à safra passada, que equivale a um incremento de quase 700 mil hectares. Já o estado do Tocantins teve uma redução de 5,4% na produtividade, em relação à safra anterior, o que foi ocasionado por um veranico que ocorreu, em dezembro e janeiro, prejudicando as lavouras, em todas as fases de desenvolvimento, sendo as áreas mais arenosas e de cascalho as mais atingidas (CONAB, 2019).

A cultura da soja tornou-se amplamente difundida por suas variadas formas de utilização em diferentes segmentos, tendo um papel importante para a economia brasileira, sendo utilizada para a produção de proteína animal e com uma crescente na alimentação humana, consolidando uma cadeia agroindustrial, sendo também uma alternativa para a utilização na fabricação de biocombustíveis (CONAB, 2017).

Nas últimas duas décadas, a soja se consolidou como a principal cultura do agronegócio brasileiro. Nesse período, o grão liderou a expansão da fronteira agrícola nacional e passou a ser cultivada em vários ambientes de produção. Com uma cadeia produtiva bem estruturada e que interage com outras, também, importantes para o agronegócio nacional, como carnes e biocombustíveis, a soja tem proporcionado o desenvolvimento socioeconômico de diversas regiões as quais compõem os sistemas de produção (HIRAKURI et al., 2017).

O consumo mundial de proteína animal, sobretudo, das carnes de frango e de suíno, cresceu expressivamente nas últimas duas décadas. Um dos impactos gerados por este fato foi o aumento na demanda por farelos proteicos, utilizados na fabricação de ração animal, normalmente, oriundos de grãos de soja (HENCHION et al., 2014). No ano agrícola 1996/97, quase 97% do produto era voltado para a alimentação humana. Porém o aumento exponencial no esmagamento de soja, em virtude da demanda pelo seu farelo, fez com que o crescimento na produção do óleo fosse superior à sua demanda para alimentação. Isso gerou um excedente do produto, que passou a ser direcionado, para o mercado industrial, notadamente o de biocombustíveis (BENAVIDES et al., 2013).

Tanto para uso alimentar como industrial, o aumento do teor de óleo do grão tem sido um dos principais objetivos da engenharia de oleaginosas. A soja é uma das fontes de óleo vegetal, em maior produção mundial, compreendendo 30% do mercado global, sendo que, no Brasil, é matéria-prima com maior importância na utilização para a produção de biodiesel, o que compreende a, aproximadamente, 90% do biodiesel produzido no país (CAVALETT; ORTEGA, 2010).

Dall'Agnol (2017) evidencia que o grão de soja se tornou um protagonista, para vários derivados, destacando para o óleo de soja e seu consumo mundial. Não sendo a razão principal, para cultivar a soja em escala mundial, esse derivado está cada vez mais sendo requisitado em atividades de consumo doméstico e para a produção de biodiesel.

### **3.2 Biodiesel, teor de óleo**

Com o rápido crescimento populacional e desenvolvimento industrial, o consumo mundial de energia aumenta. Diante disso, algumas fontes alternativas de energia, como solar, hidrogênio, eólica e biodiesel se tornaram o viés para suprir a demanda energética. Entre essas fontes renováveis, o biodiesel é considerado um combustível alternativo proeminente, não tóxico, biodegradável e fonte de energia renovável (GOLI; SAHU, 2018).

IHA et al. (2018) mostraram que o uso da biomassa como fonte de energia vem tendo grande destaque no mundo, especialmente, na aplicação de gorduras e óleos vegetais e animais, para a produção de biodiesel (ésteres de ácidos gordos metílicos ou etílicos), sendo as principais vantagens do biodiesel as suas

propriedades físico-químicas, que são similares às do diesel derivado do petróleo, fazendo, assim, com que o biodiesel se torne um dos mais importantes usos da biomassa neste século.

Oleaginosas que armazenam maiores quantidades de óleo são preferidas, na indústria do biodiesel, mas a quantidade de óleo possível de ser extraída é o fator determinante, para a viabilidade da matéria-prima, uma vez que o seu emprego pode reduzir o custo de produção. Neste sentido, a soja entra na contramão dessa viabilidade, visto que sua capacidade de armazenamento de óleo é baixa quando comparada a outras culturas. No entanto sua disponibilidade e cultivo, em larga escala classifica-a como a principal fonte de óleo para a produção de biodiesel (RAMOS et al., 2017).

O óleo de soja veio como um subproduto do processamento do farelo e logo se tornou um dos líderes no mercado mundial de óleos vegetais. Dada a grandeza deste agronegócio no Brasil, a soja ofereceu as bases para o desenvolvimento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Cerca de 99% dos triacilglicerídeos, presentes no óleo de soja, são compostos pelos ácidos palmítico (10,2%), esteárico (3,7%), oleico (22,8%), linoleico (53,7%) e linolênico (8,6%) sendo bastante utilizados no ramo alimentício, tanto domiciliar quanto na indústria (RAMOS et al., 2017; VEGETAIS, 2014; VELLO; SILVA, 2006).

As características de teor de proteína e teor de óleo podem ser determinadas por diversos genes. Genes estes que, para estas características, possuem correlação negativa, indicando que um alelo que representa maior teor de proteína está associado a um alelo que representa menor teor de óleo em grãos de soja e vice-versa. Em média, as cultivares de soja apresentam em torno de 40% de proteína e 20% de óleo (HWANG et al., 2014).

Para Vello & Silva (2006), a junção dos altos teores de proteína (40%) e óleo (20%), na composição da semente de soja, juntamente com a média de produtividade, faz com que a cultura da soja seja uma das culturas mais cultivadas no mundo.

### **3.3 Biossíntese de ácidos graxos e gene DGAT**

A biossíntese de óleo vegetal envolve uma rede metabólica complexa com múltiplos compartimentos subcelulares, ciclos e rotas metabólicas que têm uma função dupla na produção de lipídios essenciais de membrana e triacilglicerol (BATES, 2016).

A síntese do óleo vegetal ocorre, a partir do glicerol-3-fosfato e acil-CoA, no retículo endoplasmático, formando os triacilgliceróis (TAGs) (WANG et al., 2014).

Em várias espécies de plantas, os TAGs são grandes lipídios de armazenamento que se acumulam no desenvolvimento de sementes. Esses TAGs são armazenados, geralmente, em um compartimento especializado que se encontra na maioria das células vegetais oleaginosas (CAGLIARI et al., 2011).

Triacilgliceróis (TAGs) são ésteres derivados de ácidos graxos que apresentam uma classe de lipídios neutros, representando-se na forma de armazenamento de energia celular (ATHENSTAEDT; DAUM, 2006; YEN et al., 2008). Na grande maioria das sementes oleaginosas, incluindo a soja, sua principal forma de armazenamento de lipídios ocorre na forma de triacilglicerol (TAG). Um fator limitante atual, para controlar a biossíntese de óleo na semente, é a ambiguidade que existe dentro do controle do fluxo de acil em várias modificações de ácidos graxos e rotas biossintéticas. Mudanças na composição do ácido graxo do óleo foram alcançadas pelo isolamento de genes que codificam enzimas do metabolismo lipídico e aplicação de técnicas genéticas para controlar a expressão desses genes (BATES, 2016).

Settlage et al. (1998) relatam que o óleo é uma característica quantitativa herdada, por isso, a atividade da enzima DGAT pode ser um indicador de expressão de produtos genéticos, em toda a síntese de glicolipídeos, para um determinado genótipo. A atividade da enzima DGAT está associada, diretamente, com a expressão da variação genética do teor de óleo na soja.

A DGAT é considerada uma enzima-chave para fins biotecnológicos, podendo ser utilizada, para aumentar o teor de óleo em espécies de plantas oleaginosas, sendo considerada a única enzima que está exclusivamente comprometida com a biossíntese de TAG usando acil-CoA como dador de acil (LARDIZABAL et al., 2008; XU et al., 2008).

Como tal, tem sido uma das enzimas mais estudadas em termos do seu potencial de aumentar o teor de óleo de semente por meio da expressão do gene

*DGAT*. As DGATs desempenham papéis essenciais na determinação da qualidade e quantidade do fluxo de Acil-CoA na síntese de TAG (SNYDER et al., 2009).

A atividade enzimática DGAT é codificada por diferentes genes, o que reforça sua importância na síntese de TAG, em plantas e seus papéis distintos, na determinação da qualidade e quantidade de fluxo de acil-CoA, na síntese de TAG. Os genes *DGAT1* e *DGAT2* foram amplamente estudados, na maioria dos organismos eucarióticos, incluindo fungos, animais, algas e plantas (TURCHETTO-ZOLET; CHRISTOFF; KULCHESKI, 2016a). Análises filogenéticas e evolutivas desses genes demonstraram que o *DGAT1* e *DGAT2* evoluíram separadamente com convergência funcional durante a evolução eucariótica. Além dos genes *DGAT1* e *DGAT2* em plantas, outros genes relacionados com DGAT também foram identificados. Um gene solúvel DGAT (*DGAT3*) que participa da via citosólica de síntese TAG foi identificado, pela primeira vez, em amendoim (*Arachis hypogaea*) e, mais recentemente, em *Arabidopsis thaliana* (AYMÉ et al., 2018; TURCHETTO-ZOLET et al., 2011).

Assim, uma atenção significativa vem sendo dada às DGATs como ferramentas biotecnológicas, para a melhoria na produção de TAG em oleaginosas, a exemplo da soja, milho e colza, o que vem ao encontro da crescente demanda por óleos e biocombustíveis (CHEN et al., 2016).

### **3.4 Fatores Ambientais**

No Brasil, a soja tem sido cultivada, em várias condições ambientais, desde regiões frias, com altitude superior a 1200 m, até regiões quentes, com baixas altitudes e latitudes, gerando diferentes potenciais para a sua produção. Nesse contexto, a análise da dinâmica da área cultivada, produção e produtividade de grãos são importantes para alinhar ações de pesquisa e de transferência de tecnologia em diferentes regiões produtoras da cultura (BALBINOT JUNIOR et al., 2017).

Hammond et al. (2005) afirmam que o teor e composição de cada ácido graxo do óleo de soja podem ser afetados pelas diferentes cultivares, fatores ambientais e geográficos e, principalmente, pelas condições climáticas.

Sendo assim, a estabilidade do desempenho em ambientes é considerada essencial para a liberação de cultivares de soja com qualidade de óleo melhorada (CARVER et al., 1986), já que os teores de proteína e óleo de soja, bem como a composição de ácidos graxos são determinados pelo genótipo e podem variar de acordo com o ambiente (LUEDDERS, 1977).

Para Albrecht et al. (2008), a baixa incidência de precipitação e altas temperaturas, no período de enchimento de grãos, podem ocasionar alterações na biossíntese de óleo, levando a diferentes comportamentos entre as cultivares. Mundstock & Thomas (2005) declaram que a sensibilidade a fatores como fotoperíodo, temperatura do ar, acamamento, retenção foliar e déficit hídrico podem afetar no crescimento da planta e no rendimento de grãos.

A soja tem dois períodos críticos bem definidos com relação à falta de água: da semeadura à emergência e no enchimento dos grãos. Neumaier et al. (2000) afirmam que, durante a fase de enchimento de grãos, a ocorrência de déficit hídrico, acompanhado de altas temperaturas, pode ocasionar o enrugamento dos grãos de cultivares sensíveis, reduzindo o rendimento e a qualidade dos grãos.

Percebe-se que a necessidade de água disponível aumenta progressivamente com o desenvolvimento da cultura da soja. A falta de água em qualquer estágio de desenvolvimento, altera a quantidade de massa produzida e, com isso, afeta o balanço entre o crescimento vegetativo e reprodutivo (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

Uma vez que ocorre o estresse hídrico na planta, no período de enchimento de grãos, conteúdos da semente, como o teor de óleo, terão uma redução maior em sua taxa do que a de teor de proteína (ROTUNDO; WESTGATE, 2009a).

Assim que a planta entra em condição de déficit hídrico, é desencadeada uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares, em resposta à essa nova condição, como a redução da parte aérea, fechamento estomático e queda na taxa fotossintética (SHAO et al., 2008).

Para Ferrari et al. (2015), o estresse hídrico provoca alterações, como a redução do potencial hídrico foliar, o fechamento estomático, a diminuição da taxa fotossintética, a redução da sua parte aérea, a aceleração da senescência, abscisão das folhas, dentre outras.

Levitt (1980) observou, em seu estudo, que durante o déficit hídrico os ajustamentos fisiológicos da planta determinam as respostas adaptativas de ordem

anatômica e morfológica, contudo essas respostas variam, de acordo com a espécie, a cultivar, o estado de desenvolvimento das plantas, como também a duração e a intensidade do déficit hídrico.

Outro fator que causa a diminuição no teor de proteína e no óleo da soja é a temperatura. Em trabalho realizado por Rotundo & Westgat (2009b), foi constatado que o déficit hídrico associado a altas temperaturas, no estágio de enchimento de grãos da planta de soja, leva à diminuição no teor de óleo.

Temperaturas elevadas, durante o desenvolvimento da semente, na cultura da soja, frequentemente, resultam em sementes de baixo vigor, aumento da incidência de patógeno e diminuição do valor econômico (CHEBROLU et al., 2016).

Entretanto Carreira et al. (2011) concluíram que ambientes com altas temperaturas melhoram a relação ácido oleico/linoleico, enquanto os ambientes temperados promovem altos níveis de ácidos graxos essenciais (linoleico, linolênico). Existe uma relação inversa entre os dois ácidos graxos que pode ser influenciada pelas condições do ambiente, especialmente, temperatura.

Barbosa et al. (2011) identificaram que temperaturas mais altas e menores médias de precipitação, durante a fase de enchimento de grãos, favoreceram o acúmulo de óleo nos grãos, resultado também encontrado por Nogueira et al. (1983), que mostraram que variação na temperatura pode exercer um maior efeito na síntese de óleo, de maneira que temperaturas altas aumentam o conteúdo de óleo.

Wolf et al. (1982) relatam que, durante o desenvolvimento da semente, a temperatura ambiente afeta profundamente a composição da semente de soja e a sua qualidade é melhorada quando ocorre elevação da temperatura.

### **3.5 Déficit Hídrico**

A água constitui, aproximadamente, 90% do peso da planta, atuando praticamente em todos os processos fisiológicos e bioquímicos, desempenhando função de solvente, por meio do qual gases, minerais e outros solutos entram nas células e movem-se por meio da planta. A disponibilidade de água é importante, sobretudo, em dois estádios de desenvolvimento da cultura da soja: germinação-emergência e floração-enchimento. Características como composição química do grão podem variar em função de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores

ambientais, a disponibilidade hídrica é considerada um dos fatores de maior impacto na produção e qualidade dos grãos (FARIAS et al., 2007; MORANDO et al., 2014; VEIGA et al., 2010).

A exigência hídrica da cultura da soja aumenta, conforme o desenvolvimento da cultura, tendo sua demanda máxima no florescimento e no início da formação de vagens. A falta de água, no início do ciclo da soja, pode causar fortes reduções na emissão de novos ramos, reduzindo, potencialmente, o número de nós que iriam produzir vagens. No entanto a planta pode se recuperar parcialmente, caso ocorra a disponibilidade de água, após o florescimento, podendo, assim, emitir e fixar um número maior de flores nos novos nós, para produzir vagens, podendo, ainda, reduzir a formação de novas folhas para sustentar o enchimento de grãos da planta (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

O déficit hídrico tende a desorganizar o equilíbrio das plantas, mudando as condições fisiológicas e afetando a atividade de algumas enzimas e provocando o acúmulo de proteínas e solutos compatíveis, açúcares, glicina betaína e aminoácidos. Além disso, provoca a inibição da produtividade das culturas e altera o metabolismo dos lipídios que auxiliam na síntese da membrana (FORD; BARBER, 1983; GONG et al., 2005).

Afzal et al. (2014) afirmam que a seca desencadeia um desequilíbrio entre a absorção de água pela raiz e a transpiração foliar, o que causa uma redução no crescimento e desenvolvimento das plantas. Atividades físico-químicas, como a fotossíntese, podem ser prejudicadas pelo fechamento estomático e a consequente diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub>. Ao longo dos anos, as plantas desenvolveram mecanismos de resistência ao estresse hídrico que as ajudaram, em sua sobrevivência, mecanismos esses que variam entre espécies (FARIAS et al., 2007).

Secas, durante o período reprodutivo (pós-florescimento), causam reduções drásticas no rendimento de grãos, em razão de maior abortamento de flores e de vagens, menor período de florescimento, menor número de grãos por legume, menor período de enchimento de grãos, diminuição da qualidade de grãos e aceleração da senescência foliar (CUNHA et al., 2001).

### **3.6 Genes relacionados ao déficit hídrico**

Nas últimas décadas, a cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) vem tendo uma grande importância para a economia mundial. O grão produzido pela cultura possui uma alta versatilidade, dando origem a produtos e subprodutos amplamente utilizados pelo agronegócio. Hoje, a falta de água é um dos fatores com maior impacto na produção agrícola mundial, trazendo consequências inevitáveis aos produtores, como redução no rendimento da cultura, acarretando em perdas econômicas. Algumas dificuldades surgem ao se tentar criar tolerância à seca, usando abordagens convencionais. Além disso, tempo, intensidade, duração e frequência do déficit hídrico, bem como interações planta-solo-atmosfera, são fatores que influenciam na resposta das plantas (DIAS et al., 2016; FUGANTI-PAGLIARINI et al., 2017).

Dependendo do estresse por que a planta passe, diferentes respostas podem ser observadas, como, por exemplo, plantas submetidas ao estresse térmico, que abre os estômatos e aumenta a taxa de transpiração, ao redor da superfície da folha, enquanto uma seca combinada e um estresse térmico fazem com que os estômatos fiquem fechados, para minimizar a perda de água, evitando a evapotranspiração, levando a um aumento na temperatura foliar, afetando a fotossíntese e o crescimento (CHOUDHURY et al., 2017).

As plantas estão sujeitas a variações ambientais por meio de estresses bióticos e abióticos. Em relação ao estresse abiótico, destaca-se a seca como o fator com o maior impacto no rendimento de culturas de grande importância em todo o mundo, incluindo a soja. Diferentes mecanismos são empregados pelas plantas para se protegerem contra déficits hídricos, incluindo mudanças na condutância estomática, ajuste osmótico, o acúmulo de moléculas osmoprotetoras e a atividade de proteínas antioxidantes (MARCOLINO-GOMES et al., 2015).

As características agronômicas em uma cultura determinam o fenótipo da planta, o qual é controlado por múltiplos genes e sinais ambientais (FICKLIN; FELTUS, 2013). Com isso, a melhoria no rendimento sob condições de estresse (por exemplo, seca) pode ser beneficiada com uma abordagem integrativa, combinando diferentes níveis (órgão, plantas individuais, cultura) de fenotipagem, juntamente com caracterização molecular (LIU et al., 2017).

Eventos moleculares são iniciados pela percepção do estresse hídrico, percepção que está relacionada a alterações no volume celular, causado pela desidratação e, conseqüentemente, alterações na pressão da parede celular e no potencial osmótico. Essas modificações alteram a estrutura celular, ativando complexos enzimáticos que desencadeiam eventos em cascata, levando à expressão de muitas categorias de genes envolvidos na ativação de respostas de defesa. Fatores de transcrição (TFs) sensíveis à desidratação, como (DREB), *no apical meristem* (NAC), *Arabidopsis transcription activation factor* (ATAF), *cup-shapedcotyledon* (CUC), *myeloblastosis related proteins* (MYB) e outras famílias, ativam as vias de resposta ao estresse que são específicas para diferentes condições. Muitos desses TFs também mediam as respostas de diferentes hormônios do estresse, como o ácido abscísico (ABA) e o etileno, que governam as respostas do estresse abiótico. Considerando que a resposta ao estresse envolve uma grande rede genética e complexa de mecanismos moleculares, um ponto crítico é definir quais genes são necessários, para combinar em uma planta, a fim de fazer essa relação com a tolerância ao estresse hídrico (DIAS et al., 2016; JANGALE et al., 2019; ULLAH et al., 2018).

### **3.6.1 Família do gene *DREB***

Com uma preocupação exacerbada pelas mudanças climáticas, que vêm acontecendo em tudo o mundo, tal preocupação tornou-se importante tema de pesquisa para cientistas. Diante de tantas informações processadas, ao longo desses anos, em pesquisas voltadas para o déficit hídrico em plantas, um importante passo foi dado no meio científico, que foi a identificação de um elemento responsivo à desidratação cis-ação (DRE), cuja função é importante para a expressão de genes que correspondem à desidratação em *Arabidopsis thaliana* (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Os fatores de transcrição DREB estão no topo da cascata de eventos moleculares que finalizam com respostas à defesa contra a desidratação celular. Em *Arabidopsis thaliana*, a identificação da proteína DREB1A foi possível, depois da identificação de uma região conservada denominada DRE (*Dehydration Responsive Element* – elemento responsivo à desidratação), elemento cis-atuante presente na região promotora de vários genes ativados durante

condições de seca (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). A proteína DREB1A atua como um fator de transcrição e possui, em sua estrutura, o domínio ERF/AP2 (*ethylene responsive factor* - fator responsivo ao etileno/ APET ALA), que interage, especificamente, com a região DRE dos genes de resposta, regulando a sua expressão à defesa vegetal contra a dessecação celular (KAVAR et al., 2008).

Mais de 50 genes *DREB*, nas últimas duas décadas, foram identificados em diversas culturas, entre os quais muitos desses genes *DREB* são regulados sob via dependente e independente do ABA. Estudos indicam que diferentes fatores de transcrição *DREB* têm função específica, em resposta ao estresse hídrico, salino, térmico e estresse de baixa temperatura. Com base em sua estrutura, as proteínas *DREB* podem ser divididas em seis subgrupos: A-1 a A-6, sendo que a maioria dos genes do tipo *DREB1* e *DREB2* estão envolvidos com respostas ao estresse abiótico (KIDOKORO et al., 2015; LATA; PRASAD, 2011).

Nakashima et al. (2014), em estudos, evidenciaram que a proteína de ligação a elementos responsivos à desidratação (*DREB*) desempenha um papel importante à resposta ao estresse abiótico. Fatores de transcrição da família *DREB* possuem um único domínio conservado, que faz a sua interação com genes via ABA-independente. O *DREB* também é envolvido, na regulação da via de resposta ao estresse dependente de ABA, que indica uma possível conversa cruzada entre o transdução de sinal ABA dependente e independente de ABA. Esta comunicação ilumina o papel do ABA na transdução do sinal de estresse.

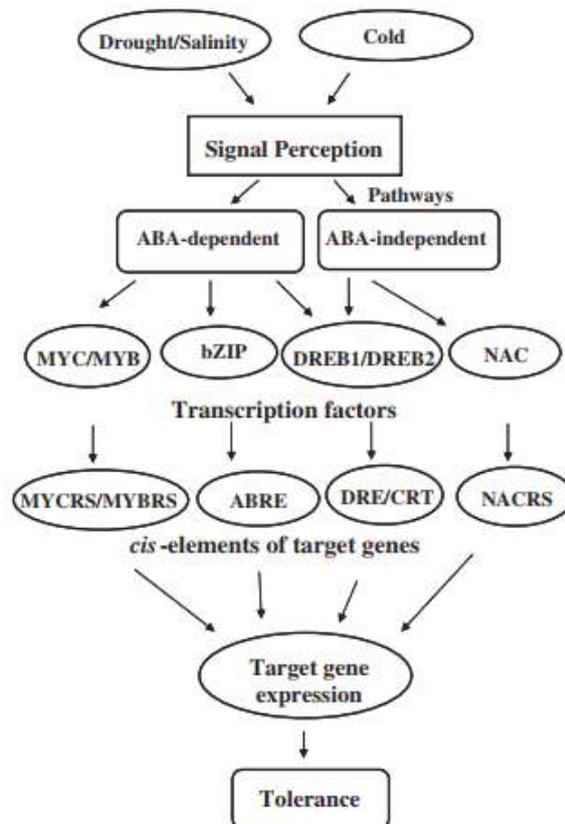


Figura 1- Esquema ilustrando as rotas ABA dependente e independente em resposta aos estresses abióticos como seca, alta salinidade e frio. Os fatores de transcrição responsáveis pela indução dos genes de resposta aos estresses e respectivos elementos cis-atuantes e exemplos de genes-alvo estão ilustrados. Fonte: Lata & Prasad, 2011.

Diferentes membros dos subgrupos da família *DREB* desempenham diversos papéis em plantas. Dois genes da subfamília, A1 (*MbDREB1*) e A6 (*MbDREB6*), foram recentemente identificados na maçã por meio da PCR. Os resultados mostraram que ambos foram induzidos por estresse abiótico múltiplo (YANG et al., 2011). Kuang et al., (2017) demonstraram o envolvimento de nove genes *MaDREB* no amadurecimento de frutos de banana e estresses abióticos. Estudos transcriptômicos realizados por Hu et al. (2017) identificaram a expressão de vários FTs, incluindo o gene *MaDREB* sob estresse por frio, osmótico e salino.

Genes responsáveis pelo estresse podem ser divididos, em duas categorias principais, de acordo com suas funções: 1. genes funcionais codificadores de proteínas, incluindo genes osmorregulatórios e genes antioxidantes, que desempenham, principalmente, um papel vital na proteção de células de lesão por estresse; 2. genes reguladores, incluindo genes do fator de transcrição e genes quinase, que estão envolvidos na transdução de sinalização e regulação da expressão gênica (NAKASHIMA, et al., 2014)

### **3.7 Ferramentas biotecnológicas**

Dados biológicos advindos do conhecimento genômico são relativamente complexos, em comparação aos provenientes de outras áreas científicas, dada a sua diversidade e ao seu inter-relacionamento. A partir do conhecimento fundamental do genoma, objetiva-se compreender o conjunto de peças que atuam no funcionamento complexo de todo o organismo. Busca-se entender as estruturas moleculares das proteínas, as interações entre várias proteínas, bem como dessas com as demais moléculas biológicas (DNA, carboidratos, lipídios, etc), as diversas vias metabólicas celulares e o papel da variabilidade genética representada pelas várias formas de cada proteína. Toda essa informação disponibilizada pela ciência genômica tem sido trabalhada por meio das ferramentas de bioinformática (SANTOS; ORTEGA, 2003).

Ferramentas como a bioinformática têm sido objeto de intenso interesse, nos tempos atuais, para a integração e desenvolvimento de programas computacionais, para tratar dados biológicos pré-existentes e identificar sequências de genes, identificar inibidores enzimáticos, promover o agrupamento de proteínas, estabelecer árvores filogenéticas e analisar experimentos da expressão gênica (ARAÚJO et al., 2008; GÓES-FAVONL, 2016).

Com o aprofundamento do conhecimento do genoma, a análise da expressão de genes tornou-se uma importante ferramenta no campo da pesquisa. A PCR em tempo real, vem ao encontro do uso dessas ferramentas biotecnológicas, pois permite a detecção de um dado alvo de ácido nucleico, ou seja, de um gene, de forma rápida, específica e sensível. Gachon et al. (2004) afirmam que a PCR em tempo real, comparada com a PCR clássica, apresenta vantagens, como rapidez para fornecer dados confiáveis, alta sensibilidade e especificidade.

A técnica da PCR em tempo real, pode ser utilizada em diversas aplicações, tais como quantificação do número de cópias de um determinado gene, contaminação de alimentos, identificação de organismos geneticamente modificados, entre outras, fazendo com que seja um dos métodos mais empregados, para a avaliação da expressão gênica, por causa de sua elevada especificidade e boa reprodutibilidade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

As plantas foram cultivadas, no período de junho a outubro, entressafra de 2014, na estação experimental do Câmpus Palmas da Universidade Federal do Tocantins. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema de parcelas subdivididas. O tratamentos foram constituídos por lâminas de irrigação que induziram as plantas a déficit hídrico no período vegetativo e reprodutivo. Para a extração de RNA, foram utilizadas folhas da cultivar de soja M9144RR, dos seguintes tratamentos: 25V25R - a cultura sofreu déficit hídrico durante todo ciclo, sendo irrigada com 25% da ET<sub>pc</sub> e 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ET<sub>pc</sub> durante todo o ciclo. A coleta das amostras se deu em dois estádios fisiológicos: Vegetativo (V4) e reprodutivo (R4), sendo congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer - 80°C, o que preservou e viabilizou a sua utilização. Para cada tratamento e estágio fisiológico foram coletadas três repetições biológicas, totalizando 12 repetições. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Análises Moleculares (LAM/Saúde Humana) da Universidade Federal do Tocantins.

### 4.2 Seleção de genes

Foram analisados três genes, sendo dois relacionados ao déficit hídrico, os genes *GmDREB1* (AW308782) e *GmDREB5* (Glyma12g33020) e um relacionado com o teor de óleo, o gene *GmDGAT3A* (Glyma13g17860) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos primers dos genes estudados.

Nome do Gene	Gene Modelo	Sentido do Primer	Sequência dos Primers	Temperatura de melting (°C)	Amplicon size (bp)
<b>GmB-Actin<sup>a</sup></b>	GMU60500	F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	53.6	118
		R	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	51.7	
<b>FYVE<sup>a</sup></b>	Glyma13g17500	F	TTCTGTCTTCTGCAAGTGGTG	55.2	92
		R	GATCCCTCATCCATACATTTTCAG	53.0	
<b>DGAT3A<sup>b</sup></b>	Glyma13g17860	F	CGAGAAACTTGCCATGTTCC	54.3	140
		R	GTTTGGCCTTTATCTCTTGCTTT	54.0	
<b>GlyDREB1<sup>b</sup></b>	AW308782	F	CCCTGAGCTCTCATCTTCCTTGG	59.0	240
		R	ATAGTCCCCAGCCAAATCCT	55.8	
<b>DREB5<sup>b</sup></b>	Glyma12g33020	F	TTGCCTACTACTCTCCTATATTCA TTTCC	55.6	86
		R	CCTTCAAATACACGGAGCCTTAG	55.4	

#### 4.3 Extração de RNA total e Síntese de cDNA

O RNA total de folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi extraído com o uso do reagente TRIZOL (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com o inibidor Turbo DNA-free (Ambion), para a eliminação da DNA residual. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1%. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000) a  $A_{260nm}$ . As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas, para a síntese de cDNA, com o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### 4.4 Expressão Gênica

Para a análise da expressão gênica quantitativa por RT-qPCR, foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green e o cDNA obtido a partir de RNA extraído de folhas de soja.

As condições térmicas da reação foram dois minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$  e um minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ . Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.3). Para

cada reação, foi utilizado 1 µL de cDNA (80ng), 1,5 µL de cada primer e 5,0 µL de Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen) para um volume final 10,0 µL/amostra. As amostras foram processadas em triplicatas técnicas. Os resultados foram normalizados, usando CTs (Ciclo Threshold), obtidos pela expressão dos genes de referência *GmB-Actin* e *FYVE* presentes na mesma reação. O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *Threshold*. A fórmula de Pfaffl foi utilizada para calcular a expressão relativa (PFAFFL, 2001).

A normalização foi realizada utilizando-se a equação  $\Delta CT_{alvo} = CT(\text{gene alvo}) - CT(\text{controle endógeno})$  e  $\Delta CT_{referência} = CT(\text{gene alvo}) - CT(\text{controle endógeno})$ . A calibração foi determinada pela fórmula  $E_{alvo}^{\Delta CT_{alvo}}$  e  $E_{referência}^{\Delta CT_{referência}}$ , em que E é o valor de eficiência do primers utilizado. O calibrador é uma amostra usada como base para resultados de expressão comparativa. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula  $E_{alvo}^{\Delta CT_{alvo}} / E_{referência}^{\Delta CT_{referência}}$  (PFAFFL, 2001).

## 5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Transcricional no Estádio Vegetativo (V4)

A quantificação da expressão relativa dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5*, no estágio vegetativo V4, revelou um padrão interessante, pois, mesmo a cultura sofrendo com o déficit hídrico, tratamento 25V25R, sendo irrigada com 25% da ETpc, não foi observada diferença no padrão de expressão dos genes estudados quando comparado com a testemunha (100V100R) (Fig.1 A). Esse resultado pode estar associado à plasticidade fenotípica da cultura e à relação fonte e dreno observada, no estágio V4, quando a planta conta com apenas três folhas trifolioladas completamente desenvolvidas (Fig.1 B).

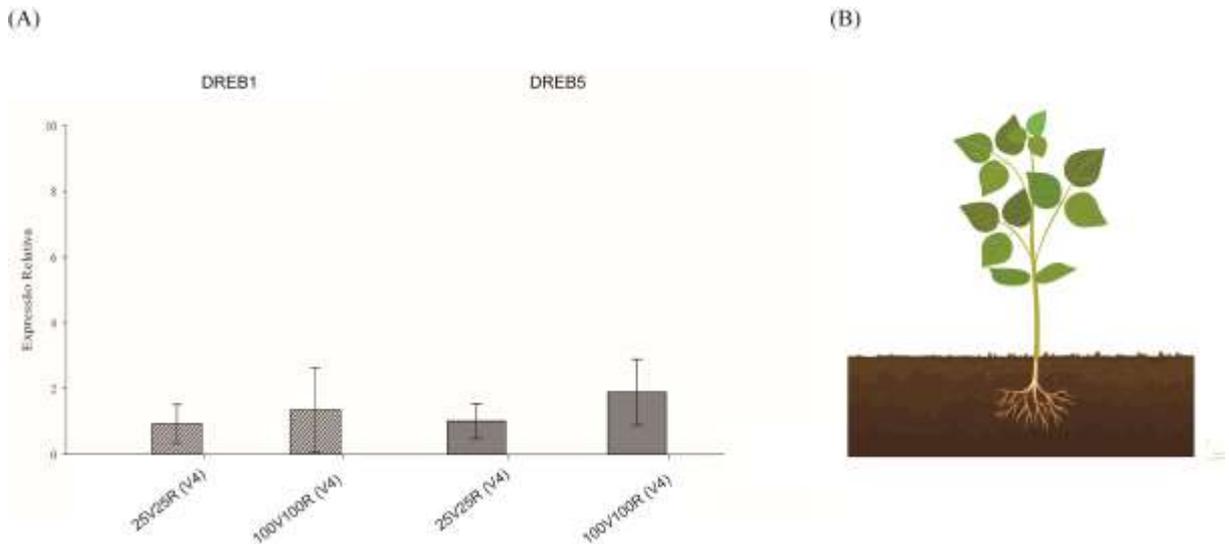


Figura 2 - Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5* em soja no estágio vegetativo (V4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. A Expressão quantitativa dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5*. B Ilustração do estágio V4 da cultura da soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (*GmB-Actin* e *FYVE*). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ETpc; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ETpc.

Em trabalho realizado com déficit hídrico em soja, Desclaux & Roumet (1996) observaram que, no estágio vegetativo V4, a característica mais sensível à falta de água foi o comprimento dos entrenós, o que ocasionou uma redução na altura da planta, ao longo da fase. O mesmo foi observado por Nunes et al., 2016, em seu trabalho, em que características como altura da planta e diâmetro do caule obtiveram as menores médias nos tratamentos submetidos ao déficit hídrico severo.

Quando o déficit hídrico ocorre, nas fases iniciais de crescimento e estabelecimento das plantas, ele se torna um fator limitante importante, para o desenvolvimento da cultura da soja, pois possui um grande potencial de afetar os processos fisiológicos e bioquímicos, como a fotossíntese, respiração, metabolismo de nutrientes, promotores de crescimento, entre outros (BARBOSA, 2017a; JALEEL et al., 2009).

Mertz-Henning et al. (2017) observaram que o déficit hídrico induzido, durante o estágio vegetativo, causa efeito negativo sobre o rendimento, mas pode ser invertido com chuvas subsequentes. O mesmo foi observado por Gava et al. (2016), em de que a ocorrência de déficit moderado e severo, nas fases de desenvolvimento vegetativo e floração e no início da frutificação, respectivamente, prejudicaram o crescimento das plantas, mas não afetaram a produtividade.

Afzal et al. (2014) ressaltam que secas severas, na fase vegetativa, reduzem o crescimento da planta e diminuem a área foliar e o rendimento de grãos, fator abiótico que desencadeia um desequilíbrio entre a absorção de água pela raiz e transpiração foliar, o que causa uma redução no crescimento e desenvolvimento das plantas, trazendo, assim, uma série de adaptações fisiológicas e efeitos prejudiciais adversos para a cultura, tais como: comprometimento metabólico da fotossíntese, dano oxidativo, alterações hormonais e acúmulo de proteínas relacionadas ao estresse, o que leva a interrupções, nos processos fisiológicos e bioquímicos, nas vias celulares e moleculares.

Para Barbosa (2017), alterações no processo fotossintético podem refletir, diretamente, em características agrônômicas, como altura de planta, diâmetro de haste e massa seca e fresca da folha e haste. Por causa da redução na taxa fotossintética, as plantas podem apresentar menor produção de fotoassimilados, que seriam destinados ao seu crescimento e desenvolvimento, podendo reduzir, assim, a produção de sementes. Uma forma de a planta escapar do estresse hídrico é completar rapidamente seu ciclo vital antes mesmo que seus tecidos atinjam uma deficiência hídrica (BIANCHI; et al., 2016).

Em nível molecular verifica-se que não houve diferença de expressão, para nenhuma das condições e genes estudados, mas Medina et al., (2019) observaram diferença significativa na expressão dos genes DREB1 e DREB2, em plantas de trigo em estádios de desenvolvimento, quando submetidos ao déficit hídrico, sugerindo um importante papel na integração das respostas das plantas às condições de crescimento e na correção com o transporte de água.

Hoekstra et al. (2001) afirmam que, durante o déficit hídrico, diferentes mecanismos de proteção são ativados, agindo em diferentes estágios. Em decorrência, uma rede de genes envolvidos, na defesa da planta é ativada, mas a ativação desses genes está associada a diferenças nas características estomáticas e fisiológicas entre variedades tolerantes e suscetíveis (JANGALE et al., 2019). Uma característica fisiológica, observada por Shi et al. (2017), foi a de que, com a expressão do gene *DREB1*, ocorreu a inibição do crescimento, característica que não foi observada por Feng et al. (2019), quando nenhuma inibição do crescimento foi verificada com a expressão do gene *ZjDREB1.4* na fase de crescimento vegetativo.

Para Bergamaschi et al. (2006), a ocorrência do déficit hídrico, durante o período vegetativo, reduz o crescimento, mas, durante o período vegetativo, não se tem a formação dos componentes do rendimento, logo os efeitos sobre a produção de grãos são reduzidos posteriormente. As condições hídricas podem vir a tornar-se favoráveis, trazendo assim níveis satisfatórios de rendimento de grãos; o mesmo foi observado por Gava et al. (2016a), em que, mesmo com déficit hídrico, na cultura da soja nas fases fenológicas de desenvolvimento vegetativo, floração ao início da frutificação e maturação, componentes de produção, podem não ser afetados.

## **5.2 Análise Transcricional no Estádio Reprodutivo (R4)**

Quanto à análise da expressão dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5*, no estágio reprodutivo R4, foram observados maiores níveis de expressão, para as plantas, que foram submetidas ao déficit hídrico (25V25R). Quando analisados os genes individualmente, observou-se que o *GmDREB1* teve um aumento, nos níveis de expressão de quatro vezes, quando comparado à testemunha (100V100R); já o gene *GmDREB5* chegou a um incremento de oito vezes (Figura - 2 A). Essa resposta pode estar associada aos mecanismos moleculares que a planta ativa, para lidar com o déficit hídrico, em um estágio (R4) crucial do desenvolvimento, pois as vagens já estão completamente desenvolvidas e a planta necessita de uma maior disponibilidade de água (Figura - 2 B).

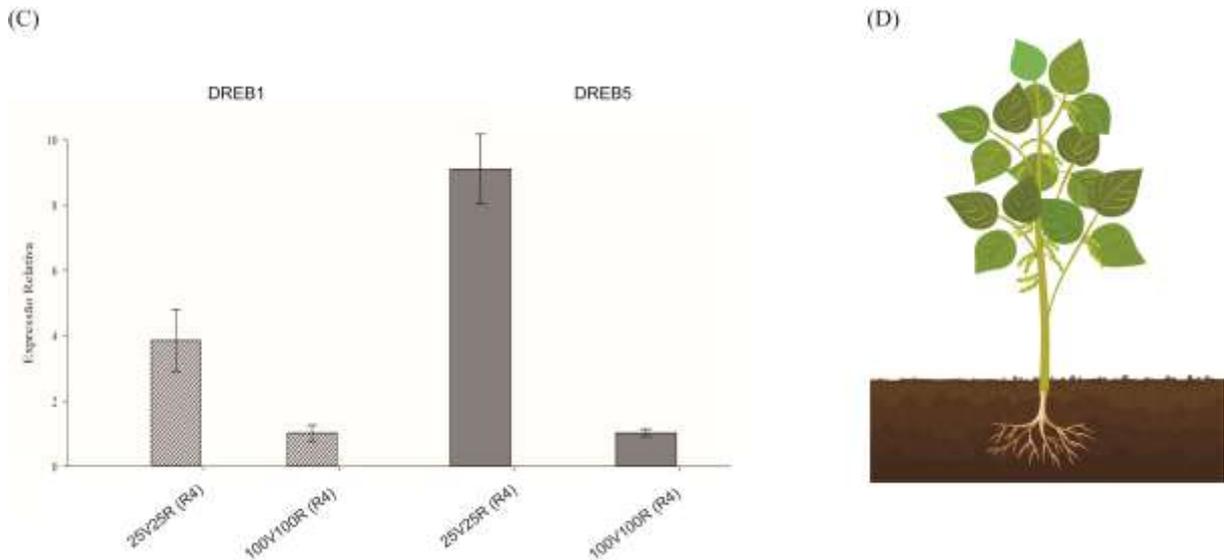


Figura 3 - Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5* em soja no estágio reprodutivo (R4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. **A** Expressão quantitativa dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5*. **B** Ilustração do estágio R4 da cultura da soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (*GmB-Actin* e *FYVE*). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ET<sub>pc</sub>; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ET<sub>pc</sub>.

Dependendo do momento, em que ocorre o estresse hídrico, a planta de soja responde de maneiras diferentes. Quando o estresse ocorre no início da floração, a planta reduz o número de vagens; quando a falta de água tem início, após a floração e durante o período de floração, ocorre uma redução no número de vagens por planta e também no tamanho das sementes. Souza et al., (2013) observaram que, quando o estresse hídrico ocorre, no estágio de desenvolvimento R5, as características afetadas são o número de grãos por vagem e o peso dos grãos, o mesmo observado por Nunes et al. 2016, cujas características agrônômicas, como altura de inserção de primeira vagem, número de vagens por planta, apresentaram as menores médias, quando submetidas ao estresse hídrico severo, durante todo o ciclo. Resultados de trabalho feito por Souza et al., (2013) mostraram que, quando o déficit hídrico ocorre no início da floração (R1) e no momento em que as vagens estão completamente desenvolvidas (R4), a produção de sementes é reduzida, significativamente, quando comparada com a fase em que o grão está cheio ou completo (R6) e início da maturação (R7).

Uma das reações da planta a condições extremas é o menor crescimento e aceleração do processo reprodutivo, reações que, especialmente, estão relacionadas com alta temperatura do ar e pouca disponibilidade hídrica, pois, estando a planta sob alta temperatura e condições hídricas desfavoráveis, ocorre acentuação no processo de respiração (EMBRAPA, 2011).

Medina et al. (1997) observaram que cultivares de soja reduziram os dias, para a maturação, quando foram semeadas em época tardia, fato também observado por Amorim et al. (2011), que também verificaram o efeito de variações climáticas, tais como temperatura e precipitação no número de dias para a maturação. A necessidade de água aumenta, durante o desenvolvimento da cultura, atingindo o máximo no período de floração/enchimento de grãos. Neste período, a planta necessita de sete a oito mm dia<sup>-1</sup>, decrescendo logo após essa etapa do ciclo. O estresse hídrico, neste período, pode ocasionar problemas fisiológicos graves que ocasionam queda prematura de folhas e conseqüente redução de produtividade (GAVA, 2014).

A diferença, no padrão de expressão analisado com os genes *GmDREB1* e *GmDREB5* relacionados à resposta à seca, ilustra como um ou mais mecanismos podem ser ativados, para lidar com o déficit hídrico, durante o período em que a planta mais necessita da disponibilidade de água. Uma relação fisiológica que pode ser observada, na cultivar M 9144 RR, em condições de estresse, é o fato do fechamento dos estômatos que, provavelmente, ocorre como um mecanismo para manter a água na célula. A explicação, para o fechamento estomático, durante o estresse hídrico, depende do fito-hormônio ABA, que é visto como uma pedra angular da função estomática, porque tem se mostrado um gatilho que aciona respostas a canais de membranas de células-guarda e transportadores, que causam uma redução no turgor de células-guarda, fechando, assim, os estômatos (BAUER et al., 2013).

Fuganti-Pagliarini et al. (2017) afirmam, em resultado obtido, que genes relacionados à deficiência hídrica mostraram maior expressão, em condição de seca, mostrando que as plantas podem alterar o metabolismo, em resposta a esta circunstância ambiental adversa, visando a diferentes mecanismos, como sobrevivência e produtividade.

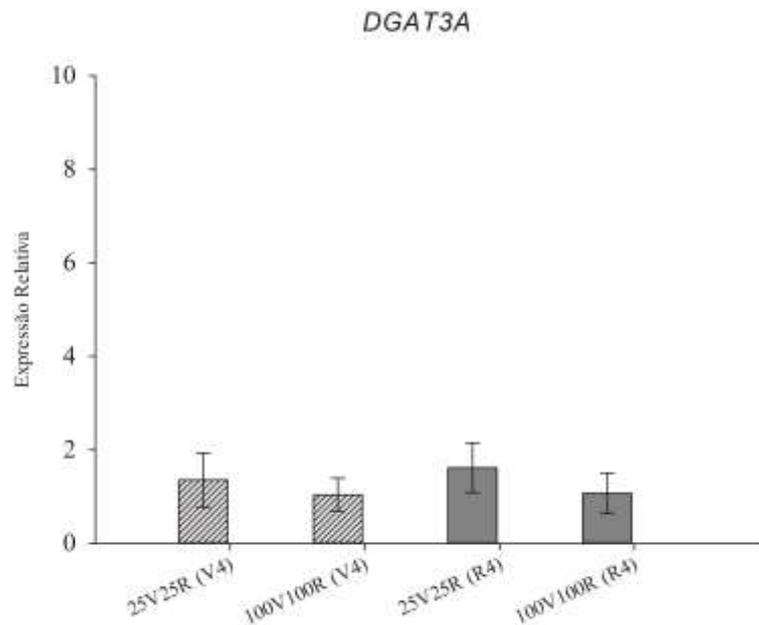
Stolf-Moreira et al. (2010) verificaram, em experimento, com cultivares de soja, o aumento de duas a três vezes na expressão do gene *GmDREB1*, quando

submetidas ao déficit hídrico, em relação à testemunha e destaca que alguns genes são induzidos por estresse e codificam produtos que podem conferir tolerância a condições adversas. Zhou et al. (2018) observaram grande número de genes tendo diferentes expressões, em diversas vias, indicando que a soja emprega mecanismos complexos para lidar com o déficit hídrico.

Marcolino-Gomes et al. (2013), em trabalho com soja, identificaram padrão diferente, na expressão do gene *GmDREB5*, em tecidos radiculares e foliares, que teve maior expressão nas folhas que nas raízes de ambas as cultivares estudadas. Le et al. (2012) observaram que dois genes em soja que codificam ortólogos de *Arabidopsis DREB1A* e *DREB1D* da família AP2\_EREBP e ZAT10 / STZ da família C2H2\_Zn foram induzidos em folhas, no estágio vegetativo, mas não em folhas no estágio reprodutivo, acreditando que esses FTs possam estar envolvidos, na regulação de resposta ao déficit hídrico, durante o crescimento vegetativo.

Em estudos com déficit hídrico em maçã, Yang et al. (2011) observaram que o gene *MbDREB1*, que codifica o FTs do tipo *DREB1*, apresentou superexpressão, quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, mostrando, assim, um aumento à tolerância ao frio, à seca e ao alto estresse salino. Esses dados demonstram que o déficit hídrico desencadeia respostas tanto conservadas, quanto específicas, que ativam vários genes, dependendo dos estádios de desenvolvimento e/ou intensidade do déficit hídrico.

#### **5.4 Análise Transcricional no Estádio Vegetativo (V4) e Reprodutivo (R4) do gene *DGAT3A***



*Figura 4 Perfil da expressão quantitativa relativa por RT-qPCR do DGAT3A em soja no estágio vegetativo (V4) e reprodutivo (R4). As colunas representam a expressão de transcritos gênicos em folhas de soja. Todos os transcritos gênicos foram normalizados pela expressão de múltiplos genes de referência (GmB-Actin e FYVE). Tratamentos: 25V25R, a cultura sofreu déficit hídrico durante todo o ciclo, sendo irrigada com 25% da ETpc; 100V100R, tratamento em que as plantas não sofreram déficit hídrico, sendo irrigadas com 100% da ETpc.*

As análises de expressão do gene DGAT3A não apresentaram diferença significativa para nenhuma das condições. Uma resposta, para esse resultado, seria que genes DGAT1, DGAT2, DGAT3 e WS / DGAT codificam enzimas com uma função comum na formação TAG, porém podem ter padrões de expressão divergentes, em diferentes espécies e em diferentes órgãos e tecidos dentro da mesma espécie (TURCHETTO-ZOLET et al., 2016).

Hernández et al. (2012) afirmam que o gene DGAT3, geralmente, é expresso em tecido vegetativo, particularmente, no desenvolvimento de mudas, enquanto sua expressão no desenvolvimento de sementes não é comum entre plantas oleaginosas. A DGAT solúvel de mamona (RcDGAT3) tem sua expressão, durante o desenvolvimento de sua semente, na fase S2, quando a semente está totalmente expandida (CAGLIARI et al., 2010). Dados do transcriptoma de mamona mostram que a expressão da DGAT3 é relativamente maior em folhas que nos outros tecidos (BROWN et al., 2012). Resultado parecido foi obtido em tungue (*Vernicia fordii*), em que se verificou que esta enzima é mais expressa em flores e folhas que em sementes (CAO et al., 2013).

Já Hovav et al. (2015) encontraram maior expressão do gene DGAT3, em relação aos genes DGAT1 e DGAT2, em semente de algodão e acreditam que o gene DGAT3 tenha contribuição única para uma rota alternativa de incorporação de FAs em TAG. O mesmo foi visto por Rosli et al. (2018), acreditando que exista a possibilidade de que o EgDGAT3 tenha uma função similar ao EgDGAT1 e esteja envolvido na biossíntese do TAG.

## 6. CONCLUSÃO

1. As análises de expressão dos genes *GmDREB1* e *GmDREB5* mostraram que o estresse hídrico sofrido pela cultivar durante todo o ciclo teve maior expressão no estágio reprodutivo, evidenciando mecanismos que podem ser ativados para lidar com o déficit hídrico durante o período em que a planta mais necessita da disponibilidade de água.
2. A expressão do gene *DGAT3A* não mostrou o padrão esperado para nenhum dos tratamentos e estádios fenológicos da cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, A. et al. Water deficit-induced regulation of growth , gas exchange , chlorophyll fluorescence , inorganic nutrient accumulation and antioxidative defense mechanism in mungbean [ *Vigna radiata* ( L . ) Wilczek ]. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 156, p. 147–156, 2014.
- ALBRECHT, L. P. et al. Teores de óleo, proteínas e produtividade de soja em função da antecipação da semeadura na região oeste do paraná. **Bragantia**, v. 67, n. 4, p. 865–873, 2008.
- AMORIM, F. A. et al.  poca de semeadura no Potencial produtivo de Soja em Uberlândia-MG. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4Sup1, p. 1793, 2011.
- ARAÚJO, N. D. DE et al. A Era da Bioinformática : seu potencial e suas implica es para as ciências da saúde. **Estudos de Biologia**, v. 30, p. 143–148, 2008.

ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. **The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2 jun. 2006.

AYMÉ, L. et al. Arabidopsis thaliana DGAT3 is a [ 2Fe-2S ] protein involved in TAG biosynthesis. n. October, p. 1–10, 2018.

BALBINOT JUNIOR, A. A. et al. Análise da área, produção e produtividade da soja no Brasil em duas décadas (1997-2016). **Boletim de Pesquisa Número 11**, p. 21, 2017.

BARBOSA, L. A. LIMITE CRÍTICO DO POTENCIAL HÍDRICO DA SOJA DURANTE OS ESTÁDIOS VEGETATIVO E REPRODUTIVO. **Universidade Federal de Uberlândia**, p. 91, 2017a.

BARBOSA, L. A. LIMITE CRÍTICO DO POTENCIAL HÍDRICO DA SOJA DURANTE OS ESTÁDIOS VEGETATIVO E REPRODUTIVO. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2017b.

BARBOSA, V. DA S. et al. Comportamento de cultivares de soja, em diferentes épocas de semeaduras, visando a produção de biocombustível. **Revista Ciência Agronômica**, p. 742–749, 2011.

BATES, P. D. Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 9, p. 1214–1225, 2016.

BAUER, H. et al. The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. **Current Biology**, v. 23, n. 1, p. 53–57, 2013.

BENAVIDES, P. T.; SALAZAR, J.; DIWEKAR, U. Economic Comparison of Continuous and Batch Production of Biodiesel Using Soybean Oil. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 1, p. 11–24, 2013.

BERGAMASCHI, H. et al. Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 243–249, 2006.

BIANCHI, L.; GERMINO, G. H.; SILVA, M. DE A. Adaptação das Plantas ao Déficit Hídrico. **Acta Iguazu**, v. 5, p. 15–32, 2016.

BROWN, A. P. et al. Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

CAGLIARI, A. et al. Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway. **Plant Science**, v. 179, n. 5, p. 499–509, 2010.

CAGLIARI, A. et al. Biosynthesis of triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. **International Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 40–52, 2011.

CAO, H. et al. Developmental Regulation of Diacylglycerol Acyltransferase Family Gene Expression in Tung Tree Tissues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

CARRERA, C. et al. Environmental Variation and Correlation of Seed Components in Nontransgenic Soybeans: Protein, Oil, Unsaturated Fatty Acids, Tocopherols, and Isoflavones. **Crop Science**, v. 51, n. 2, p. 800, 2011.

- CARVER, B. F. et al. **Response to environmental variation of soybean lines selected for altered unsaturated fatty acid composition.** *Crop science*, 1986.
- CAVALETT, O.; ORTEGA, E. Integrated environmental assessment of biodiesel production from soybean in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, n. 1, p. 55–70, 2010.
- CHEBROLU, K. K. et al. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. **Metabolomics**, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2016.
- CHEN, B. et al. Two types of soybean diacylglycerol acyltransferases are differentially involved in triacylglycerol biosynthesis and response to environmental stresses and hormones. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–16, 2016.
- CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.
- CONAB. A produtividade da soja: análise e perspectivas. v. 10, p. 1–35, 2017.
- CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos. **Observatório Agrícola**, v. 2, n. 4, p. 1–60, 2019.
- CUNHA, G. R. et al. Zoneamento agrícola e época de semeadura para soja no Rio Grande do Sul Agricultural zoning and sowing dates for soybean in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, n. 3, p. 446–459, 2001.
- DALL'AGNOL, A. **Soja lidera pauta de exportação**. Disponível em: <<https://blogs.canalrural.uol.com.br/embrapasoja/2017/05/12/soja-lidera-pauta-de-exportacao/>>. Acesso em: 28 set. 2018.
- DESCLAUX, D.; ROUMET, P. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars. **Field Crops Research**, v. 46, n. 1–3, p. 61–70, 1996.
- DIAS, L. P.; DE OLIVEIRA-BUSATTO, L. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. The differential expression of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] WRKY genes in response to water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 288–300, 2016.
- EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013. 2011.
- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da Soja**, 2007.
- FÁTIMA, B. DE; PINHEIRO, S.; MAIA, S. G. Biodiesel : uma nova fonte de energia obtida pela reciclagem de óleos residuais. **Bolsista de Valor: Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 1, p. 417–426, 2010.
- FENG, W. et al. A DREB1 gene from zoysiagrass enhances *Arabidopsis* tolerance to temperature stresses without growth inhibition. **Plant Science**, v. 278, n. October 2018, p. 20–31, 2019.
- FERRARI, E.; PAZ, A. DA; SILVA, A. C. DA. Déficit Hídrico No Metabolismo Da Soja Em Semeaduras Antecipadas No Mato Grosso. **Nativa - Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 67–77, 2015.

- FICKLIN, S. P.; FELTUS, F. A. A Systems-Genetics Approach and Data Mining Tool to Assist in the Discovery of Genes Underlying Complex Traits in *Oryza sativa*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- FORD, R. C.; BARBER, J. Time-dependent decay and anisotropy of fluorescence from diphenylhexatriene embedded in the chloroplast thylakoid membrane. **BBA - Bioenergetics**, v. 722, n. 2, p. 341–348, 1983.
- FUGANTI-PAGLIARINI, R. et al. Characterization of Soybean Genetically Modified for Drought Tolerance in Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–15, 2017.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.
- GAVA, R. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Os efeitos do estresse hídrico na cultura da soja ( *Glycine Max* , ( L .) Merrill .) Piracicaba 2014. 2014.
- GAVA, R. et al. ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE DÉFICIT HÍDRICO NA IRRIGAÇÃO DA CULTURA DA SOJA. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 10, n. 3, p. 305–315, 2016.
- GÓES-FAVONL, S. P. DE. BIOTECNOLOGIA MODERNA PARTE 1: A HISTORIA DA CIÊNCIA REVISÃO DE LITERATURA. **UNIMAR CIÊNCIAS**, v. 25, p. 20–27, 2016.
- GOLI, J.; SAHU, O. Development of heterogeneous alkali catalyst from waste chicken eggshell for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 128, p. 142–154, 2018.
- GONG, Q. et al. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 44, n. 5, p. 826–839, 2005.
- HAMMOND, E. G. et al. Soybean Oil. **Bailey’s Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi.**, n. 1, p. 577–653, 2005.
- HENCHION, M. . et al. Meat Science. **Meat Science**, p. 561–568, 2014.
- HERNÁNDEZ, M. L. et al. A Cytosolic Acyltransferase Contributes to Triacylglycerol Synthesis in Sucrose-Rescued *Arabidopsis* Seed Oil Catabolism Mutants 1 [ W ][ OA ]. v. 160, n. September, p. 215–225, 2012.
- HIRAKURI, M. et al. Estratégia de transferência de tecnologia e comunicação para a sustentabilidade da sojicultura brasileira. **Embrapa Soja**, v. 392, p. 26, 2017.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanism of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001.
- HOVAV, R. et al. A Transcriptome Profile for Developing Seed of Polyploid Cotton. **The Plant Genome**, v. 8, n. 1, p. 0, 2015.
- HU, W. et al. Comparative physiological and transcriptomic analyses provide integrated insight into osmotic, cold and salt stress tolerance mechanisms in banana. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

- HWANG, E.-Y. et al. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1, 2014.
- IHA, O. K. et al. Extraction and Characterization of Passion Fruit and Guava Oils from Industrial Residual Seeds and Their Application as Biofuels. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 00, p. 1–7, 2018.
- JALEEL, C. A. et al. Drought Stress in Plants A Review on Morphological. **INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY**, v. 11, n. 1, p. 100–105, 2009.
- JANGALE, B. L. et al. Independent and combined abiotic stresses affect the physiology and expression patterns of DREB genes differently in stress-susceptible and resistant genotypes of banana. **Physiologia Plantarum**, v. 165, n. 2, p. 303–318, 2019.
- KAVAR, T. et al. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Molecular Breeding**, v. 21, n. 2, p. 159–172, 2008.
- KIDOKORO, S. et al. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. **Plant Journal**, v. 81, n. 3, p. 505–518, 2015.
- KUANG, J.-F. et al. The transcriptional regulatory network mediated by banana (*Musa acuminata*) dehydration-responsive element binding (MaDREB) transcription factors in fruit ripening. **New Phytologist**, v. 214, n. 2, p. 762–781, 2017.
- LARDIZABAL, K. et al. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in Seed Increases Oil in Soybean. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 89–96, 2008.
- LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4731–4748, 2011.
- LE, D. T. et al. Differential Gene Expression in Soybean Leaf Tissues at Late Developmental Stages under Drought Stress Revealed by Genome-Wide Transcriptome Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. **Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses.**, n. Ed. 2, 1980.
- LIU, H.; ABLE, A. J.; ABLE, J. A. Genotypic water-deficit stress responses in durum wheat: Association between physiological traits, microRNA regulatory modules and yield components. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 5, p. 538–551, 2017.
- LUEDDERS, V. D. Effect of seedcoat color on protein and oil content of soybeans. **Journal of Heredity**, v. 68, n. 5, p. 321–322, 1 set. 1977.
- MARCOLINO-GOMES, J. et al. Expression Patterns of GmAP2/EREB-Like Transcription Factors Involved in Soybean Responses to Water Deficit. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62294, 2013.
- MARCOLINO-GOMES, J. et al. Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

MEDINA, P. F. et al. PRODUÇÃO DE SEMENTES DE CULTIVARES PRECOSES DE SOJA EM DUAS ÉPOCAS E DOIS LOCAIS PAULISTAS: I. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E PRODUTIVIDADE. **Bragantia**, v. 56, p. 291–303, 1997.

MEDINA, S. et al. The Plant-Transpiration Response to Vapor Pressure Deficit (VPD) in Durum Wheat Is Associated With Differential Yield Performance and Specific Expression of Genes Involved in Primary Metabolism and Water Transport. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. January, p. 1–19, 2019.

MERTZ-HENNING, L. M. et al. Effect of Water Deficit-Induced at Vegetative and Reproductive Stages on Protein and Oil Content in Soybean Grains. **Agronomy**, v. 8, n. 1, p. 3, 2017.

MME. Boletim dos Biocombustíveis - Jul/Ago de 2017. **Ministério de Minas e Energia**, v. 110, p. 24, 2017.

MONTEIRO, F. J. F. et al. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de soja para produtividade de óleo nos grãos. **Revista Agrarian**, v. 10, n. 35, p. 18–21, 2017.

MORANDO, R. et al. Déficit Hídrico: Efeito Sobre a Cultura Da Soja. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, n. especial, p. 114–129, 2014.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. p. 31, 2005.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. May, p. 1–7, 2014.

NAOE, A. M. L. et al. Efeito Do Déficit Hídrico E Época De Semeadura Sobre Os Teores E Rendimentos De Óleo E Proteína Em Cultivares De Soja No Tocantins. **Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata**, v. 116, n. 2, p. 193–199, 2018.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Plantas Geneticamente Modificadas para Tolerância a Estresses Abióticos. **Ainfo - EMBRAPA**, 2010.

NEUMAIER, N. et al. Estresses de ordem ecofisiológica. In: **Estresses em soja**. [s.l.: s.n.]. p. 45–64.

NOGUEIRA, S. S. S.; HAAG, H. P.; MIRANDA, M. A. . Época de semeadura nos teores de óleo e proteína de dois cultivares de soja, UFV-1 e IAC-7, de ciclos tardios de maturidade. **Anais da E.S.A. “Luiz de Queiroz”**, v. XL, p. 667–686, 1983.

NUNES, A. C. et al. Agronomic aspects of soybean plants subjected to deficit irrigation. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 7, p. 654–659, 2016.

PETTER, F. A. et al. Produtividade e qualidade de sementes de soja em função de doses e épocas de aplicação de potássio. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 89–100, 2014.

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

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Raw Materials, Production Technologies and Fuel Properties. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.

- ROSLI, R. et al. In silico characterization and expression profiling of the diacylglycerol acyltransferase gene family (DGAT1, DGAT2, DGAT3 and WS/DGAT) from oil palm, *Elaeis guineensis*. **Plant Science**, v. 275, n. May, p. 84–96, 2018.
- ROTUNDO, J. L.; WESTGATE, M. E. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. **Field Crops Research**, v. 110, n. 2, p. 147–156, 2009.
- SAHA, S. et al. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. **Plant Physiology**, v. 141, n. 4, p. 1533–1543, 2006.
- SANTOS, F.; ORTEGA, J. Bioinformática aplicada à Genômica. **Melhoramento Genômico, Minas Gerais: UFV**, 2003.
- SETTLAGE, S. B.; KWANYUEN, P.; WILSON, R. F. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 7, p. 775–781, 1998.
- SHAO, H.-B. et al. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 3, p. 215–225, 2008.
- SHI, Y. et al. The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 59, n. 2, p. 118–133, 2017.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 3, p. 217–223, 2000.
- SNYDER, C. L. et al. Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. **New Biotechnology**, v. 26, n. 1–2, p. 11–16, 2009.
- SOUZA, G. M. et al. Soybean Under Water Deficit: Physiological and Yield Responses. **Intech open**, v. 2, p. 64, 2013.
- STOLF-MOREIRA, R. et al. Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 858–867, 2010.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 263, 2011.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; CHRISTOFF, A. P.; KULCHESKI, F. R. Diversity and evolution of plant diacylglycerol acyltransferase ( DGATs ) unveiled by phylogenetic , gene structure and expression analyses. v. 538, p. 524–538, 2016a.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; CHRISTOFF, A. P.; KULCHESKI, F. R. Diversity and evolution of plant diacylglycerol acyltransferase ( DGATs ) unveiled by phylogenetic , gene structure and expression analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 538, p. 524–538, 2016b.
- ULLAH, A. et al. A novel cotton WRKY gene, GhWRKY6-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 4, p. 439–454, 2018.
- VANDOIR, P. Uso dos herbicidas pré-emergentes na cultura da soja . p. 1–6, 2017.

VEGETAIS, L. Dossiê Óleos. v. 31, p. 38–55, 2014.

VEIGA, A. D. et al. INFLUÊNCIA DO POTÁSSIO CALAGEM do potássio E QUÍMICA , QUALIDADE FISIOLÓGICA E NA ATIVIDADE. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 953–960, 2010.

VELLO, N. A.; SILVA, L. A. S. Genética busca atender ao consumo humano crescente. **Visão Agrícola**, n. 5, p. 60–62, 2006.

WANG, Z. et al. Overexpression of SiDGAT1, a gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase from *Sesamum indicum* L. increases oil content in transgenic *Arabidopsis* and soybean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 119, n. 2, p. 399–410, 2014.

WOLF, R. B. et al. Effect of Temperature on Soybean Seed Constituents - Oil, Protein, Moisture, Fatty-Acids, Amino-Acids and Sugars. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 59, n. 5, p. 230–232, 1982.

XU, J. et al. Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 8, p. 799–818, 2008.

YANG, W. et al. Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. **Planta**, v. 233, n. 2, p. 219–229, 2011.

YEN, C.-L. E. et al. *Thematic Review Series: Glycerolipids*. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 11, p. 2283–2301, 2008.

ZHOU, X. et al. Physiological and transcriptomic responses of reproductive stage soybean to drought stress. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 12, p. 1611–1624, 2018.

