



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEIDY CRISTIANE AMARAL

**ANÁLISE DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DA  
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM SOJA  
SUBMETIDA A DÉFICIT HÍDRICO**

---

Londrina  
2010

LEIDY CRISTIANE AMARAL

**ANÁLISE DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DA  
EXPRESSION DIFERENCIAL DE GENES EM SOJA  
SUBMETIDA A DÉFICIT HÍDRICO**

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

Orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
Co-orientador: Dra. Fabiana Aparecida Rodrigues

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A485a Amaral, Leyde Cristiane

Análise de respostas fisiológicas e expressão diferencial de genes em soja submetida a déficit hídrico/ Leyde Cristiane Amaral. – Londrina, 2010.  
68 f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nemopomuceno.

Co-orientador: Fabiana Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Melhoramento genético – Teses. 2. Soja – Condições hídricas – Teses. 3. Plantas – Resistência à seca – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. 5. Plantas – Genética molecular – Teses. I. Nepomuceno, Alexandre Lima. II. Rodrigues Fabiana. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.34

LEIDY CRISTIANE AMARAL

**ANÁLISE DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E DA EXPRESSÃO  
DIFERENCIAL DE GENES EM SOJA SUBMETIDA A DÉFICIT  
HÍDRICO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
UEL/Embrapa Soja – Londrina – PR

---

Dr. Ricardo Vilela Albdelnoor  
UEL/Embrapa Soja – Londrina – PR

---

Dra. Francismar Corrêa Marcelino  
UEL/Embrapa Soja – Londrina – PR

Londrina, 26 de março de 2010.

## DEDICATÓRIA

*Dedico:  
Ao meu filho Luca a razão de toda  
minha força, com muito amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me deu saúde, força e condições para estudar.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia molecular.

A todos os docentes e a Sueli pela paciência.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária por ter dado condições adequadas para minha pesquisa.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, meu orientador, por ter me aberto as portas para a pesquisa, por entender minhas dificuldades e me incentivar a continuar.

A Dr. Fabiana Rodrigues por me coorientar, me auxiliando em todas as etapas.

Aos técnicos do laboratório, Silvana, César, Vieira e Márcia pelo auxílio e ensinamentos.

A Verinha pelas conversas, carinho e apoio.

A Dra. Francismar Corrêa Marcelino por fazer parte de minha banca e em diversos momentos me ajudar a esclarecer dúvidas.

A Dra. Maria Cristina pelas análises estatísticas.

Ao Dr. Ricardo V. Albdenor por participar da minha qualificação e defesa.

A Dr. Renata Stolf Moreira pelos ensinamentos, conselhos, e por participar de minha banca de qualificação, sempre contribuindo muito para meu trabalho.

A Cibelle Engels que sempre me estendeu a mão, me ajudou em tudo mesmo quando ela estava cheia de coisas para fazer, uma pessoa rara, uma ótima amiga.

A Paula Camargo e João Maldonado meus amigos, pelos ótimos momentos, ajuda e incentivos.

A Glória e Joice pelo apoio e pela companhia, vocês fazem muita falta.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal Maria Thereza, Michelle, Larissa, Adriana, Mayra, Paulo, Hitomi, André, Lizandra, Renata Fuganti, Amanda, Valéria, Salvador, Thiago, Juliana cahinhos, Juliana bombom, Juliane, Cinara, Euziane.

A minha mãe que tanto amo, que sempre me apoio e confiou na minha capacidade me dando incentivo quando achei que não era capaz.

Ao meu pai que me desafiou e me fez mostrar para ele e para o mundo que poderia mudar o que era comum em minha família, que eu poderia sim, ser formada em uma faculdade pública e me tornar uma Mestre.

A minha irmã que sempre esteve comigo, me fazendo companhia.

Ao meu marido que simplesmente me amou e superou minha ausência, enfim teve muita paciência.

Ao meu filho Luca a razão da minha vida, que me acompanhou nas aulas e no trabalho durante quase toda a gestação sem me dar o mínimo de trabalho. Pelo seu sorriso, tão lindo, que me dá tanta força e alegria de viver!.

Enfim agradeço a todos que, direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida e contribuíram para a realização deste trabalho me ajudando a vencer mais esta etapa.

***Muito Obrigada***

AMARAL, Leyde Cristiane. **Análise das respostas fisiológicas e da expressão diferencial de genes em soja submetida a déficit hídrico.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes do mundo, devido à crescente demanda mundial por alimentos e às novas aplicações na indústria de biocombustíveis e bioprodutos. Nesse cenário o Brasil situa-se como o segundo maior produtor mundial com uma produção de 69,582 milhões de toneladas (safra 2009/2010). Entre os fatores que reduzem a produtividade das lavouras, a seca é um dos principais responsáveis por perdas na produção brasileira de soja. Em situações de déficit hídrico, vários mecanismos são acionados pela planta para aumentar a tolerância à seca. Conhecer esses mecanismos e como ocorre a regulação dos genes expressos em resposta à seca, é essencial na identificação de rotas metabólicas envolvidas nos processos de defesa, e, conseqüentemente, no desenvolvimento de estratégias moleculares para obtenção de plantas mais tolerantes. Para prospectar genes expressos em condições de déficit hídrico, as cultivares de soja Embrapa 48 e BR 16 foram cultivadas em sistema hidropônico e utilizadas para construir bibliotecas de cDNA com base na técnica de Híbridização Subtrativa Supressiva. Após a indução do déficit hídrico, as plantas foram avaliadas para verificar o efeito do estresse. As análises de fotossíntese, condutância estomática, taxa de transpiração, concentração interna de CO<sub>2</sub>, eficiência do uso da água, entre outros parâmetros, mostraram que, apesar da cultivar Embrapa 48 apresentar um desempenho superior a BR 16, as alterações fisiológicas que ocorreram nas plantas durante a aplicação do déficit hídrico foram semelhantes para as duas cultivares, e que após 100 minutos de déficit hídrico a condição fisiológica avaliada foi significativamente modificada. A partir das bibliotecas subtrativas sintetizadas usando o tecido foliar da cultivar BR 16 foram identificados o total de 5286 transcritos. Após a classificação funcional, a busca por genes relacionados à resposta ao déficit hídrico revelou genes envolvidos na percepção e sinalização, transporte de água e solutos, proteção celular, fatores de transcrição, entre outros de grande importância no processo de tolerância ao déficit hídrico. Esses resultados visam a descoberta de genes-chaves envolvidos nas respostas das plantas à seca, auxiliando no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes via melhoramento clássico e engenharia genética.

**Palavras chave:** *Glycine Max*. Déficit hídrico. Tolerância. Expressão gênica diferencial. Déficit hídrico.

Amaral, Leyde Cristiane. **Analysis of physiological responses and differential gene expression in soybean subjected to water deficit**. 2010. 68 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important crops in the world due to growing world food demand and the new applications in biofuels and bioproducts industry. In this scenario, Brazil ranks as the second largest world producer with a production of 69.582 million tons. Among the factors that reduce crop productivity, drought is the main responsible for losses in Brazilian soybean production. In water deficit conditions, various mechanisms are triggered by the plant to increase drought tolerance. To know these mechanisms and how does the regulation of the genes expressed in response to drought works, it is essential to identify metabolic pathways involved in defense, and hence to development of molecular strategies to obtain plants more tolerant to drought. To prospect genes expressed in water deficit conditions, Embrapa 48 and BR 16 soybean cultivars were grown hydroponically and used to construct cDNA libraries based on Suppression Subtractive Hybridization method. After water deficit treatment, plants were evaluated to verify the effect of the stress. The analyses of photosynthesis, stomatal conductance, transpiration rate, intercellular CO<sub>2</sub> concentration and water use efficiency, among other parameters, showed that, despite the Embrapa 48 cultivar presented a higher performance, physiological changes that occurred in plants during the water deficit treatment were similar for both cultivars, and that after 100 minutes under water deficit the physiological condition evaluated was significantly modified. From the subtractive libraries synthesized using leaves of cultivar BR 16 were identified a total of 5.286 transcripts from all three analyzed libraries. After perform the functional classification, the search for genes related in response to water deficit showed genes involved in sensing and signaling, transport of water and solutes, cell protection, transcription factors, among others, very important in the tolerance to water deficit. These results allow the discovery of key genes involved in plant responses to drought, assisting the development of cultivars more tolerant through classical breeding and genetic engineering.

**Keywords:** *Glycine max*. Tolerance. Differential gene expression. Cascade. Water deficit.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Evapotranspiração total e média diária da soja em sub-períodos de desenvolvimento (Fonte: Berlato; Bergamaschi, Sem. Nac. de Soja, 1979).....24
- Tabela 2** – Número e porcentagens de sequências conhecidas e desconhecidas após anotação automática e Manual dentro das bibliotecas do genótipo BR-16 submetido a estresse hídrico.....63
- Tabela 3** – Genes relacionados à percepção e transdução de sinais de estresse, os dados demonstram bibliotecas em que os genes foram encontrados e o número de vezes em que aparecem .....66
- Tabela 4** – Fatores de Transcrição encontrados nas bibliotecas, os dados demonstram as bibliotecas em que esses apareceram e o número de sequências similares com esses fatores dentro das bibliotecas .....67
- Tabela 5** – Sequências relacionadas a transporte de água e íons, ajuste osmótico e proteção celular, detoxificação e outros tipos de sequências relacionadas a resposta ao estresse hídrico encontrados nas bibliotecas L1, L2 e L3 e o número de similares encontrados em cada biblioteca .....68

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Diagrama esquemático da SSH. Linhas sólidas representam os cDNAs digeridos com *Rsa* I. Caixas preenchidas representam a parte externa do adaptador 1 e 2R, que são idênticas e complementares ao iniciador da primeira PCR. Caixas vazias representam a parte interna do adaptador 1 e são complementares ao iniciador interno 1 da segunda PCR. Caixas sombreadas representam a parte interna do adaptador 2R e são complementares ao iniciador interno 2R da segunda PCR (BD BIOSCIENCES, 2004) .....41
- Figura 2 –** A - Sementes germinadas em papel de filtro, demonstrando o tamanho das plântulas na implantação do experimento. B – plantas em estágio V1. C – raízes crescendo em solução nutritiva. D – Plantas em estágio V3 prontas para coleta .....49
- Figura 3 –** Modelo esquemático para a formação dos *bulks* usados no isolamento do mRNA Poly-A. Amostras dos diferentes tempos de estresse foram coletadas em triplicata R1, R2 e R3 e tiveram seu RNA extraído separadamente. Para o isolamento de RNAm foi feito mix com a mesma quantidade de RNA total de cada repetição. Os RNAm obtidos foram utilizados através da formação de *bulks* para servirem de amostras *tester* (plantas estressadas) e amostra *driver* (plantas controle) na construção da biblioteca .....51
- Figura 4 –** Montagem dos *bulks* de RNAm para a síntese das bibliotecas subtrativas. Uma quantidade equimolar de Mrna de cada amostra inicial foi utilizada foi usada para montar os *bulks* que serviram como molde (*tester*) para a construção das bibliotecas. O processo de subtração foi realizado pela adição do Mrna proveniente das plantas do tratamento controle – sem estresse (T0 *driver*). Os *bulks* 1, 2 e 3 representam, respectivamente as bibliotecas subtrativas L1, L2eL3 .....52

- Figura 5 –** Média de Parâmetros Fisiológicos dos Cultivares BR-16 e Embrapa48 submetidos ao déficit hídrico, os valores apresentados são valores de teste de médias para tempo de aplicação de estresse e cultivar (Teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ ). Figura 5A: taxa fotossintética ( $\text{micro mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), Figura 5B: condutância estomática ( $\text{mol HO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), Figura 5C: concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $\text{micro mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), Figura 5D: taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão; as letras maiúsculas demonstram diferenças entre os cultivares dentro de cada tempo e as minúsculas demonstram as diferenças entre os tempos dentro de cada cultivar; letras iguais não apresentam diferença estatística observadas pelo teste de Tukey .....59
- Figura 6 –** Média de Parâmetros Fisiológicos dos Cultivares BR-16 e Embrapa48 submetidos ao déficit hídrico, os valores apresentados são valores de teste de médias para tempo de aplicação de estresse e cultivar (Teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ ). Figura 6A: Diferença de pressão de vapor (MPa). Figura 6B: Temperatura ambiente x Temperatura Foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão; as letras maiúsculas demonstram diferenças entre os cultivares dentro de cada tempo e as minúsculas demonstram as diferenças entre os tempos dentro de cada cultivar; letras iguais não apresentam diferença estatística observadas pelo teste de Tukey .....60
- Figura 7 –** Curva de eficiência do uso de água ao longo dos tempos de aplicação de estresse para os cultivares BR 16 e Embrapa 48.....61
- Figura 8 –** Número de sequências obtidas através do seqüenciamento das bibliotecas subtrativas de folha do genótipo BR-16. L1 representa a biblioteca obtida por plantas submetidas a estresse de 25 e 50 minutos; L2 representa a biblioteca de plantas submetidas a estresse de 75 e 100 minutos e L3 de

125 e 150 minutos. Partes sobrepostas no gráfico representam sequências comuns entre as diferentes bibliotecas .....62

**Figura 9 –** Espécies mais representadas entre os similares encontrados no NCBI e GenBank para as seqüências das três bibliotecas e os respectivos números de similares encontrados .....64

**Figura 10 –** Categorização das bibliotecas L1(25 e 50 minutos de estresse), L2 (75 e 100 minutos de estresse, L3 (125 e 150 minutos de estresse. Gráficos obtidos pela descrição dos processos biológicos ou função molecular (GO) obtidos através de análises no GeneOntology .....65

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico;
<b>ABRE</b>	ABA-binding responsive element - elemento de ligação resposivo ao ABA;
<b>APETALA2</b>	Primeira proteína que foi identificada o domínio AP2;
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidase;
<b>AP2</b>	Domínio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos encontrado;
<b>BiP</b>	Chaperone Binding Protein;
<b>CAT</b>	Catalase;
<b>CBL's</b>	Calcineurin B-like proteins;
<b>CDPK</b>	“Calcium Dependent Protein Kinases” ou Proteínas kinases de pendentas de Cálcio;
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento;
<b>Cor</b>	cold regulated
<b>DRE</b>	Dehydration Element Responsive - elemento responsivo à desidratação,
<b>DREB</b>	Dehydration Responsive Element Binding - Elemento ligante de resposta à desidratação, DREB2A – Dehydration Responsive Element Binding
<b>2A</b>	Elemento ligante de resposta à desidratação 2A;
<b>DPV</b>	Diferença de pressão de vapor;
<b>erd</b>	early response to dehydration - resposta precoce para a desidratação;
<b>ESTs</b>	“Expressed sequence tags” ou Etiquetas de sequencias expressas;
<b>Genbank</b>	Banco americano de seqüência de DNA e proteínas;
<b>GR</b>	glutathiona reductase;
<b>Gs</b>	Condutância estomática;
<b>HOG</b>	“high-osmolarity glycerol”;
<b>HSP</b>	“Heat Shock Protein” ou Proteínas de choque térmico;

<b>IP3</b>	Inositol 1, 4,5-trifosfato;
<b><i>kin</i></b>	cold inducible
<b>LEA</b>	“Late Embryogenesis-Abundant Proteins” ou Proteínas abundantes na embriogênese tardia;
<b><i>lti</i></b>	low temperature induced
<b>L1</b>	Biblioteca Subtrativa de Folha do genótipo BR16 com 25 e 50 minutos de estresse;
<b>L2</b>	Biblioteca Subtrativa de Folha do genótipo BR16 com 75 e 100 minutos de estresse;
<b>L3</b>	Biblioteca Subtrativa de Folha do genótipo BR16 com 125 e 150 minutos de estresse;
<b>MAPK</b>	“Mitogen-activated protein kinase” ou Proteína quinase ativada por mitogeno;
<b>MIPs</b>	Major intrinsic proteins;
<b>MYB</b>	Myeloblastosis oncogene – oncogene mieloblastose;
<b>MYC</b>	Myelocytomatosis oncogene – oncogene mielocimatose;
<b>NCBI</b>	“National Center for Biotechnology Information” ou Centro Nacional (Americano) de Informação Biotecnológica;
<b>PCR</b>	“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase;
<b>PIPs</b>	Proteínas intrínsecas de membrana;
<b>PIP2</b>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato;
<b>P5C</b>	$\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato, substrato na biossíntese de prolina;
<b><i>rd</i></b>	responsive to dehydration;
<b>RFOS</b>	Oligossacarídeos da família rafinose;
<b>ROS</b>	“Reactive Oxygen Species” ou Espécies Reativas de Oxigênio;
<b>RPK</b>	Receptor Like kinase;
<b>SAGE</b>	“Serial Analysis of Gene Expression” ou Análise Serial da Expressão Gênica;
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase;
<b>SSH</b>	“Suppressive Subtractive Hybridization” ou Hibridização Subtrativa Supressiva;

<b>TFs</b>	“Trancrption Factor” ou Fatores de Transcrição;
<b>TIPs</b>	Tonoplast instrinsic proteins;
<b>T0</b>	controle, tempo antes da aplicação do estresse;
<b>T25...T150</b>	diferentes tempos de aplicação de estresse, TX – tempo de X minutos;
<b>USDA</b>	“United States Department of Agriculture” ou Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
3.1	TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS	21
3.2	A CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA NA ECONOMIA	25
3.3	PERCEPÇÃO E TRANSDUÇÃO DE SINAL DE ESTRESSE	26
3.4	MECANISMOS MOLECULARES	28
3.5	MECANISMOS FUNCIONAIS	32
3.6	TRANSCRIPTÔMICA	36
3.7	HIBRIDIZAÇÃO SUBTRATIVA SUPRESSIVA	38
3.8	BIOINFORMÁTICA E SUA IMPORTÂNCIA NA ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA	41
	<b>ARTIGO</b>	44
	<b>RESUMO</b>	45
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	46
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	48
2.1	OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	48
2.2	AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA	49
2.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MÉTODOS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
2.4	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ISOLAMENTO DE RNAM POLY-A	50
2.5	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA SUBTRATIVA	52
2.5.1	Síntese e Digestão de cDNA	53
2.5.2	Ligação de Adaptadores	54
2.5.3	Hibridização	54
2.5.4	Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction)	55

2.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA .....	55
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	57
3.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DE BIBLIOTECA SUBTRATIVA E <i>BLAST</i> .....	61
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é a principal oleaginosa de interesse econômico do mundo. Essa leguminosa ocupa destaque na agricultura brasileira e a partir de 2003 o Brasil participa como o segundo maior produtor mundial. Apesar da grande produção e da posição como produtor alcançada; a manutenção e expansão desses números de produção encontram diversos obstáculos, principalmente no que diz respeito a fatores bióticos e abióticos. Controlar os efeitos desses fatores é de extrema importância para a economia já que a demanda é crescente devido ao aumento constante da população e a necessidade de fontes alternativas de combustível como o biodiesel (ASSAD et al., 2007).

Entre os fatores abióticos a seca é o fator mais alarmante e limitante para a expansão da cultura encontrando relatos de perdas de até 70% na produção da região sul (ASSAD et.al., 2007). Além do déficit hídrico que já acomete algumas regiões e períodos do ano há também preocupações com as previsões ambientais de aquecimento global que estimam um grande aumento das áreas com escassez de água (STOKSTAD, 2004). O processo de aclimação das plantas a estresses ambientais está relacionado com o perfil transcricional de um grande número de genes que podem ser ativados e ou reprimidos e também de sua capacidade de adaptação e resposta, podendo ser tolerante ou sensível ao estresse. A resposta é iniciada com a percepção do estresse e a subsequente transdução de sinais, levando a ativação de várias respostas fisiológicas e metabólicas (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; BRAY, 2004). Assim, a tolerância à seca é um mecanismo complexo, envolvendo modificações fisiológicas e moleculares que agem individualmente ou em conjunto na percepção e resposta ao estresse, sendo considerada uma característica poligênica difícil de ser trabalhada no melhoramento genético clássico (BEEVER, 2000). Considerando as grandes perdas na produção de soja ocasionadas pelos eventos de seca e pela complexidade dos mecanismos de resposta tornam-se prioritários os estudos e pesquisas sobre a tolerância ao déficit hídrico. Dentro de um programa de melhoramento genético clássico para tolerância a seca, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens tolerantes como, por exemplo, a quantificação exata do efeito e severidade do estresse. Atualmente, a rápida evolução de técnicas de biotecnologia,

como seqüenciamentos em larga escala, RNA *sequencing*, silenciamento entre outros, possibilitou não só identificar fisicamente todos os genes envolvidos em uma determinada resposta fenotípica, como também isolar com precisão as sequências de DNA responsáveis por determinada característica. As técnicas de engenharia genética aliadas às técnicas de transformação vegetal têm permitido alterar a composição de componentes individuais de rotas metabólicas específicas das plantas no sentido de aumentar as defesas contra estresses bióticos e abióticos, indo além do que se consegue através das práticas de melhoramento convencional.

O trabalho apresentado se insere no projeto genosoja (Consórcio Nacional do Genoma da Soja) que visa integrar esforços dos principais grupos que trabalham com pesquisas genômicas em soja no país, em conjunto com a comunidade científica internacional, para acessar a informação do genoma da soja. O GenoSoja dá ênfase a situações de estresses bióticos e abióticos, entre eles, ocorrência de secas, Ferrugem asiática da soja (FAS) e pragas como o ataque de diferentes espécies de nematóides, que comprometem a produtividade da cultura no Brasil e no mundo. Nesse contexto este trabalho teve como objetivo gerar informações sobre expressão diferencial de genes em cultivares de soja submetidos a estresse hídrico auxiliando na compreensão da função e dos mecanismos de controle da expressão de genes presentes na soja e envolvidos nos processos de sensibilidade ou tolerância a seca. Os dados obtidos podem auxiliar de diferentes formas em especial na descoberta de genes de importância na rede de resposta as condições de estresse, genes que podem ser essenciais para aquisição de tolerância. Essas informações auxiliam no acesso ao genoma e compreensão dos mais variados mecanismos moleculares em resposta as alterações no meio ambiente otimizando as buscas por soluções para esse problema que afeta diretamente a cultura, contribuindo para a obtenção de cultivares adaptados a diferentes ambientes, tolerantes a condições adversas.

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Analisar respostas fisiológicas e moleculares apresentadas pelos cultivares de soja Embrapa 48 e BR 16 frente à aplicação de déficit hídrico pela identificação de genes diferencialmente expressos em bibliotecas subtrativas supressivas e análise de parâmetros fisiológicos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Medir as alterações ocorridas nas plantas cultivadas em sistema hidropônico em decorrência do déficit hídrico através das modificações na taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, concentração interna de CO<sub>2</sub>, temperatura foliar e diferença de pressão de vapor;

2) Obter genes diferencialmente expressos nos cultivares e em diferentes tempos de aplicação de déficit hídrico;

3) Analisar os dados obtidos nas bibliotecas subtrativas supressivas utilizando ferramentas de bioinformática para caracterizar os genes com expressão diferencial;

4) Identificar genes importantes nas respostas das plantas ao déficit hídrico para posteriores estudos de expressão e obtenção de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A CULTURA DA SOJA E SUA IMPORTÂNCIA NA ECONOMIA

A produção mundial de soja foi de 255 milhões de toneladas na safra 2009/2010 (USDA, 2010), dentro desse cenário o Brasil é responsável por um quarto da produção total. Na safra 2009/10, o Brasil obteve um recorde de 69,58 milhões de toneladas de soja, sendo a cultura que recebe maior investimento em área plantada no país e é um dos principais produtos nacionais de exportação (CONAB, 2010).

Essa leguminosa é utilizada para diversos fins, sendo empregada na alimentação humana e animal e como produto industrial. Os grãos de soja podem ser processados, gerando inicialmente o óleo, o farelo e a farinha. O farelo é utilizado na composição de rações animais, usados na pecuária e para animais de estimação. A farinha é utilizada na alimentação humana na fabricação de pães, doces e na composição de algumas massas e produtos como a carne de soja e salsichas. Além da farinha, existe o leite, um subproduto da soja, que é um bom substituto do leite convencional para pessoas com sensibilidade à lactose. O óleo de soja, o principal produto da soja, é dividido em três produtos básicos, o óleo refinado comestível utilizado em margarinas, óleos de cozinha, maionese, temperos, gorduras vegetais, produtos farmacêuticos; o óleo refinado para fins não alimentares empregado na fabricação de velas, sabões, tintas, plásticos, lubrificantes, desinfetantes, inseticidas e produção de bicompostíveis; como último produto do óleo está a lecitina usada em produtos químicos, cosméticos e têxteis, alguns alimentos e sorvetes (GÓES-FAVONI et al., 2004).

A inclusão da soja na alimentação humana no mundo ocidental tem se tornado cada vez maior devido a divulgação dos benefícios a saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. O consumo de soja e seus derivados tem sido associado à redução do risco de doenças crônicas e as isoflavonas, compostos fenólicos encontrados na soja, tem sido relacionadas a atividades anti-carcinogênicas, redução da perda de massa óssea e diminuição do colesterol sérico (GÓES-FAVONI et al., 2004).

Em janeiro de 2010 foi dada permissão legal de adicionar 5% de biodiesel no diesel de petróleo (B5), essa permissão foi adiantada em 3 anos já que na Lei 11.097 de janeiro de 2005 que regulamentou o Programa Nacional do Biodiesel – PNPB, esse percentual entraria em vigor somente em 2013. Dentre as principais matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel brasileiro, a soja se destaca como principal produto contribuindo com cerca de 80% do óleo produzido e, a previsão é de que essa situação não se modificará nos próximos anos, já que a cultura tem uma cadeia produtiva organizada e está no limite da fronteira tecnológica mundial. O biodiesel na qualidade de combustível limpo e renovável assume importância cada vez maior nessa questão sendo que a demanda por energia tem crescido significativamente, tanto nos países altamente industrializados, como nos emergentes o consumo de energia per capita, não pára de crescer e em virtude disso, a grande moeda de troca do mundo, hoje, é energia. Atualmente 80% ou mais da energia utilizada é proveniente de combustíveis fósseis e dada previsão de sinais de exaustão das fontes de petróleo anunciada para os próximos 40 anos e, os problemas ambientais que estão ocorrendo e deverão se agravar em virtude da emissão dos gases de efeito estufa causados, em grande parte, pela utilização do petróleo e seus derivados, o mundo resolveu voltar-se decisivamente para a utilização de fontes alternativas de energias limpas e renováveis em substituição aos combustíveis fósseis. Essa é a forma adequada de minimizar a emissão de gases poluentes (principalmente o CO<sub>2</sub>) que contribuem para o aquecimento global e aumentam cada vez mais a ocorrência de desastres climatológicos causando sérios prejuízos para a humanidade. Dentro desse cenário além de importância econômica e de demanda para o consumo humano a soja está relacionada a produção de energias alternativas que é de grande prioridade para o mundo (CAMPOS; CARMÉLIO, 2009; DURÃES, 2009).

A soja movimentou em 2008 mais de 17 bilhões de dólares na economia, o que representa 10% das exportações brasileiras. Sua produção está aumentando ao longo dos anos principalmente devido ao avanço das tecnologias de produção, no entanto o sucesso de todo esse complexo é, ainda hoje, extremamente dependente das condições climáticas. A queda na produção de soja tem como principal fator a seca, especialmente nos estados do centro-sul do país (FARIAS et al., 2009).

No Brasil, o Estado do Mato Grosso compreende o maior produtor de soja, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2009). Os estados do Sul do país frequentemente sofrem com a seca, sendo que o clima adverso foi o principal fator da redução da safra nacional de grãos 2008/09 segundo a CONAB a cultura da soja no Paraná está próxima de seu limite territorial e o Rio Grande do Sul não apresenta perspectivas de aumento de área cultivável (SANT'ANA; ALMEIDA, 2009).

Diferentes elementos climáticos afetam o desenvolvimento e produtividade da soja, sendo os principais a temperatura, o fotoperíodo e a disponibilidade hídrica. Dentre esses fatores inerentes a produção agrícola o clima é o de mais difícil controle, exercendo maior ação limitante as máximas produtividades. Agrava-se a isto a dificuldade de previsão de ocorrências climáticas adversas, principais fatores de risco e de insucesso na exploração das principais culturas. A seca, o excesso de chuvas, temperaturas extremas e baixa luminosidade são estresse abióticos que reduzem significativamente os rendimentos em lavouras e restringir os locais, épocas e solos, onde espécies, comercialmente importantes, podem ou não ser cultivadas (ZANCOPÉ; NASSER, 2005).

Na safra 2003/2004 as perdas na colheita foram da ordem de sete milhões de toneladas, tirando do bolso do agricultor e do país um valor aproximado de 1,3 milhões de dólares. Já na safra 2004/2005 a estiagem ocorrida provocou perdas de U\$ 2,32 bilhões. Desse total 70% das perdas foram atribuídas somente aos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, sendo que no Rio Grande do Sul a redução foi de 80% em relação a média do Estado superando a severidade das perdas constatadas na safra 1990/91 quando chegaram próximas a 70%, caindo de um rendimento médio de grãos de 2000 Kg/ha para 750 Kg/ha (EMBRAPA, 1998). A maior parte dos prejuízos é constatada na região Sul, entretanto as regiões Centro Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste tiveram registros de perdas por seca nas safras 2004/2005 (IBGE, 2009).

A escassez de água influi diretamente em todos os períodos de desenvolvimento da soja e as exigências hídricas aumentam progressivamente de acordo com a fase de desenvolvimento (Tabela 1), sendo a demanda máxima no florescimento e início da formação dos legumes, mantendo-se alta até a maturação fisiológica (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Períodos de seca são geralmente acompanhados de temperaturas irregulares, o que também pode influenciar o

desenvolvimento da planta como, por exemplo, no crescimento vegetativo da soja que é reduzido, ou nulo, em temperaturas menores ou iguais a 10°C e em temperaturas acima de 40°C o efeito é desfavorável na taxa de crescimento, provocando abortamento de flores e diminuição da capacidade de retenção dos legumes (EMBRAPA, 2009).

**Tabela 1 –** Evapotranspiração total e média diária da soja em sub-períodos de desenvolvimento (Fonte: Berlato; Bergamaschi, Sem. Nac. de Soja, 1979).

**Evapotranspiração (EPT) total e média diária em sub-períodos do ciclo da soja.**

<b>Sub-períodos de desenvolvimento</b>	<b>EPT total</b>	<b>EPT diária</b>
	.....mm.....	
Semeadura - Emergência	16	2,2
Emergência - Início do Florescimento	266	5,1
Início do Florescimento - Início da formação de Legumes	160	7,4
Início da Formação de legumes - Maturação Fisiológica	362	6,6
Maturação Fisiológica - Maturação de Colheita	36	3,7
<b>Ciclo</b>	<b>840</b>	<b>5,8</b>

A soja é predominantemente cultivada sem irrigação, assim seu desenvolvimento e rendimento são altamente dependentes da precipitação pluvial. Por se tratar de uma cultura de verão, a soja no Brasil apresenta um período fenológico que se estende de outubro a dezembro para o plantio e de janeiro a março para a colheita. Em função das diversas cultivares, o cultivo pode se estender de 120 a 150 dias. Conclui-se que modificações no regime pluviométrico, como aquelas apontadas pelos diversos cenários de mudanças climáticas, podem comprometer profundamente a produtividade e rentabilidade da soja, desencadeando processos desestruturadores das dinâmicas sociais, econômicas e ambientais. Cultivares mais adaptadas e mais produtivas em períodos de déficit hídrico, bem como o desenvolvimento de tecnologias que auxiliem as plantas a tolerar períodos prolongados de estiagem são de enorme importância econômica, social e ambiental para aumento da produção sem exploração de novas áreas e produção em níveis que possam alimentar uma população em constante crescimento (ASSAD et al., 2008; NEPOMUCENO et al., 2001).

Existem várias cultivares de soja utilizadas em diferentes partes do mundo e do Brasil, cada uma selecionada segundo as características da área a ser cultivada e resistência a pragas e doenças comuns do local. A habilidade de uma planta de suportar o estresse depende da intensidade e duração do estresse, do efeito interativo com outros estresses e o genótipo apresentado pela planta, sendo que umas possuem mais habilidade que outras dentro de uma população. Porém, essa habilidade não garante a sobrevivência da planta em longos períodos de estiagem, podendo se agravar conforme o estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra no momento do déficit hídrico. Portanto, nenhuma cultivar é totalmente tolerante a longos períodos de seca e a produção é afetada em muitos locais devido a falta de água. Não existem regras para se fazer uma classificação precisa de cultivares quanto à tolerância a seca, mas uma classificação de cunho prático foi elaborada visando estabelecer uma relação entre cultivares e tolerância, baseando-se em observações do seu comportamento na lavoura (PITOL; BROCH, 2009).

### 3.2 TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS

Toda maquinaria celular depende da água para sobreviver, assim para superar a falta de água uma planta necessita manter a integridade de membranas e organelas, funcionalidade de enzimas, evitar o acúmulo de radicais livres entre outras funções essenciais que garantam a sobrevivência de um organismo. A água é determinante para o desenvolvimento da soja, especialmente nos períodos de germinação e enchimento de grãos. Os danos funcionais e a perda de partes da planta variam de acordo com a severidade do estresse, cada planta reagindo de forma diferenciada com maior ou menor intensidade (CHAVES et al., 2003).

Os mecanismos de resposta que as plantas desenvolvem para tolerar a seca podem ser divididos em três tipos: primeiramente há o retardo da dessecação que é a capacidade de uma planta em manter a hidratação do tecido através do fechamento dos estômatos, aprofundando as raízes para extração de água, diminuindo o tamanho das células, espessando as paredes celulares,

aumentando a cerosidade da cutícula etc. A tolerância a dessecação que é a capacidade de manter seus processos vitais normalizados enquanto desidratada e a terceira categoria denominada escape da seca, engloba as plantas que completam seu ciclo durante a estação úmida, antes do início da seca. Estas são as únicas que verdadeiramente “evitam a seca” termo que era erroneamente utilizado para diversificar tipos de tolerância (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Plantas submetidas ao estresse sobrevivem fazendo um balanço entre a manutenção do potencial de turgor e redução da perda de água. As respostas das plantas ao estresse abiótico são de controle geneticamente complexo por ser uma herança multigênica, portando difícil de ser estudada e controlada devido à influência do ambiente. Sendo assim tolerância engloba a expressão de diversos genes e depende da interação de diferentes processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Os morfológicos envolvem a redução da área foliar, a murcha da folha, quantidade de cera, adaptações radiciais; os fisiológicos envolvem alterações nos níveis de transpiração, elevado e eficiente uso da água, fechamento estomático e ajuste osmótico. Já os bioquímicos estão relacionados com o acúmulo de solutos compatíveis, como proteínas e açúcares e aumento na concentração de proteínas especializadas (BRAY, 2004).

### 3.3 PERCEPÇÃO E TRANSDUÇÃO DE SINAL DE ESTRESSE

Os mecanismos moleculares de resposta à seca começam com a percepção do sinal de estresse (XIONG et al., 2002). A deficiência hídrica age diminuindo a pressão de turgor das células, alterando assim o seu potencial osmótico que aparece como sinal iniciador principal dos mecanismos de tolerância. A queda na pressão de turgor provocaria mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificando a conformação e justaposição de proteínas sensoriais, embebidas nas membranas celulares, ou provocando alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana plasmática (NEPOMUCENO et al., 2001; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Esse sinal de alteração do potencial osmótico é percebido por osmosensores que são os primeiros componentes ativados durante o estresse e iniciam a ativação dos processos de

proteção; esses osmosensores ativariam complexos enzimáticos que iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (SHINOZAKI; YAMAGUCHISHINOZAKI, 2007). Genes induzidos pelo déficit hídrico promovem tolerância da célula à desidratação; funções de proteção no citoplasma; alterações no potencial osmótico celular para aumentar a absorção de água; controle do acúmulo de íons; regulação adicional de expressão gênica; metabolização de compostos degradados pelo estresse; etc (BARTELS; SUNKAR, 2005; NEPOMUCENO et al., 2000).

O estresse hídrico acelera o processo de oxidação de componentes celulares que também podem funcionar como iniciadores de resposta; eles induzem genes para enzimas de detoxificação celular que evita o acúmulo de radicais livres prejudiciais a célula (MILLER et al., 2009; CARVALHO, 2008).

O estresse hídrico desencadeia a produção do ácido abscísico (ABA) que sinaliza para o fechamento dos estômatos e induz a expressão de genes relacionados com as respostas ao estresse. Sabe-se que milhares de genes respondem ao estresse hídrico e seu padrão transcricional tem sido identificado em diferentes estudos (SEKI et al., 2002; YAMAGUSHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Muitos dos genes conhecidos respondem ao ABA, reconhecendo-o como iniciador do sistema de regulação em resposta ao estresse; porém análises moleculares têm demonstrado a existência de duas vias regulatórias: a via dependente e a independente de ABA, ambas sinalizando a regulação transcricional de diferentes genes expressos em condições de desidratação (YAMAGUSHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Os modelos propostos para percepção do estresse em animais, leveduras e bactérias têm grande semelhança, sugerindo que os vegetais, provavelmente, tenham o mesmo sistema uma vez que semelhantes na maioria dos seres vivos (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Em condições hiperosmóticas dois tipos de osmosensores são ativados em levedura, *SLN1* e *SHO1*; a alta osmolaridade induz a perda do turgor celular levando a diminuição do volume da célula e aumentando a distância entre a membrana plasmática e a parede celular, *SLN1* está relacionado à percepção dessa mudança (REISER et al., 2003). O osmosensor *SLN1* também compõe um segundo sistema regulador que consiste na fosforilação de componentes protéicos, esse sistema é finalizado em uma rota denominada HOG que leva ao acúmulo de glicerol um osmoprotetor

importante. A proteína de membrana *SHO1* responde a mudanças osmóticas e é dependente do nível de estresse, ela ativa uma rota denominada MAPK que está relacionada a proteínas quinases que desempenham diferentes funções. O *NtC7* é um gene candidato para sensor osmótico em plantas que codifica uma proteína receptora de membrana que auxilia na tolerância quando superexpressa (TAMURA et al., 2003). Recentemente o receptor de citocinina, *Cre1* foi mencionado como sensor de estresse osmótico em plantas, sendo um segundo candidato que possui organização similar a *SLN1* (BARLETS; SUNKAR, 2005).

### 3.4 MECANISMOS MOLECULARES

As plantas após reagirem ao estímulo externo do estresse iniciam uma cascata de sinalização que ativa a expressão de genes para responder apropriadamente a situação de risco. Contrariamente a moléculas osmosensoras várias moléculas transdutoras e reguladoras são conhecidas, elas formam um conjunto de moléculas que agem em conjunto numa grande e complexa rede de sinalização e resposta (BARLETS; SUNKAR, 2005).

Os produtos de genes que respondem ao déficit hídrico resultam em uma grande variedade de funções auxiliando na tolerância da célula à desidratação, protegendo funções citoplasmáticas, alterando a absorção de água, controlando o acúmulo de íons, regulando a expressão gênica, metabolizando compostos degradados pelo estresse eliminando radicais livres (NEPOMUCENO et al., 2000; BRAY, 2004). Por esse motivo são divididos em dois grupos, o primeiro inclui as proteínas funcionais, ou seja, que protegem diretamente contra a dessecação, como proteínas LEA e osmoprotetores como prolina, glicina betaína, e o segundo grupo estaria envolvido nos mecanismos de sinalização e de regulação da expressão gênica (BRAY, 2004).

Muitas moléculas chave envolvidas na sinalização de estresse tem sido identificadas, especialmente em *Arabidopsis thaliana*; entre elas estão os fatores de transcrição *ABA Responsive Element Binding Protein 1* (AREB1), *ABA Responsive Element* (ABRE) *Binding Factor 2* (ABF2) e *Dehydration Responsive Element* (DRE) *Binding Protein 2A* (DREB2A), e proteínas quinases como as

*Receptor Like Kinase 1* (RPK1), *SNF1 Related Protein Kinase 2C* (SRK2C) e *Calcium Dependent Protein Kinases* (CDPKs) (SEKI et al., 2007).

Os fatores de transcrição são definidos como qualquer proteína necessária para a iniciação da transcrição e são classificados como fatores que reconhecem e se ligam a elementos consensuais curtos e específicos (sequências —cis || -atuantes ou elementos de resposta), localizados antes do sítio de iniciação da transcrição. Essas moléculas são sintetizadas ou ativadas em momentos ou tecidos específicos e são responsáveis pelo controle dos padrões de transcrição no tempo e no espaço. Os elementos de resposta podem estar nos promotores ou nos reforçadores também chamados de *enhancer*, que também estimulam a iniciação, mas que estão localizados a uma distância considerável do sítio de início da transcrição. Estes elementos são alvos freqüentes de regulação tecido específica ou temporal. A ligação ao DNA não é o único modo de ação para um fator de transcrição, ele pode reconhecer outro fator, pode reconhecer a enzima RNA-polimerase ou pode ser incorporado a um complexo de iniciação na presença de diversas outras proteínas (LEWIN, 2001).

A fosforilação de proteínas é o maior mecanismo para controle de funções celulares em resposta a um estímulo externo. As MAPKs formam uma cascata que modula a sinalização em células eucarióticas, incluindo as plantas. A cascata MAPK tem o aspecto de compor um grupo que liga diferentes proteínas quinases, conforme a cascata vai agindo MAPK citoplasmática induz a translocação de MAPKs para dentro do núcleo onde agem na ativação de genes através da fosforilação de fatores de transcrição (BARDWELL, 2006). A fosforilação de fatores de transcrição resulta no controle da expressão gênica que é o maior resultado de MAPK ativadas pelo estresse hídrico. No citoplasma MAPK também pode agir fosforilando enzimas específicas ou componentes do citoesqueleto, e dessa maneira a rota MAPK pode integrar uma grande variedade de sinais além de interagir com outras quinases ou proteínas G que agem na união da membrana plasmática com proteínas receptoras de membrana respondendo a estímulos extracelulares e citoplasmáticos (ZHU, 2002). Mais de 80 tipos de MAPK foram identificadas em *Arabidopsis*, sendo *AtMPK6* e *AtMPK3* são exemplos de genes ativados por estresse osmótico, já *AtMEKK1* e *AtMPK3* são ativadas por desidratação, toque e frio. Estudos recentes sugerem que diferentes estímulos ativam MAPKs que reagem sinalizando respostas específicas; isso mostra que uma mesma MAPK pode

participar de diferentes eventos de sinalização (NING et al., 2009; BARDWELL, 2006).

Estudos têm demonstrado que em células vegetais o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tem função de mensageiro secundário na grande rede de estímulo para respostas relacionadas aos mecanismos de transdução de sinal durante os estresses hídrico e salino. Existe uma estreita relação entre o metabolismo de fosfoinosítídeo e o nível de cálcio no citosol. O Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) é gerado pela hidrólise de um fosfolípido de membrana, denominado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), pela ação da fosfolipase C. O IP3 se difunde rapidamente para outras partes da célula causando o influxo de cálcio do meio extracelular e sua saída dos vacúolos intracelulares através de canais de cálcio dependentes de IP3. Diferentes estímulos externos levam a modificações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  que tem natureza transitória e dependente da intensidade do estímulo; essas mudanças no nível de cálcio citosólico podem levar a ativação de vários genes de resposta à seca (KIM, et al., 2007; MORI et al., 2006). Além da expressão gênica os sinais de cálcio podem regular a atividade de enzimas e canais iônicos, resultando em diversas respostas a nível celular (SNEDDEN; FROMM, 2001).

Existem moléculas que funcionam como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  que formam classes bem categorizadas em plantas, as duas mais citadas são calmodulinas, CDPKs (*Calcium-dependent protein kinase*) e CBLs (*Calcineurin B-like proteins*), todas envolvidas na transdução de sinais de estresse (ZHU, 2000). Estudos recentes com variedades de arroz tolerantes e sensíveis a estresse osmótico demonstrou a importância das CDPK's na resposta a estresses; CDPK's específicas foram induzidas rapidamente e tiveram sua expressão sustentada por um longo período na variedade tolerante comparada com a sensível (KAWASAKI et al., 2001).

Como já mencionado a regulação transcricional depende da interação de fatores de transcrição com sequências de regulação "cis". A fosforilação de proteínas regulatórias é o maior evento de controle da expressão gênica em eucariotos, sendo que a interação proteína-proteína e/ou proteína-DNA frequentemente determina a taxa de transcrição pela ativação ou repressão de um promotor em condições de estresse. Duas classes de elementos de DNA responsivos à seca são bem caracterizadas, são *ABA-responsive element* (ABRE) e *dehydration responsive element* (DRE). Ambos são referidos como elementos "cis"-

atuante na resposta a estresse osmótico em plantas (BARLETS; SUNKAR, 2005). Como a aclimação à seca e frio dependem do controle transcricional, os elementos “cis” atuantes são de extrema importância, pois os fatores de transcrição (TF's) interagem com eles no mecanismo de regulação que pode ser ABA dependente ou independente (SHINOZAKI et al., 2003; ZHANG et al., 2004).

Alguns elementos de resposta ABRE têm sido identificados, eles possuem dimínios (C/T)ACGTG(G/T) que funcionam na ativação de muitos genes. Presente na seqüência de alguns elementos ABRE se encontra o *motif* CACGTG conhecido como G-box, ele funciona na regulação de genes em plantas estimuladas por uma variedade de sinais do ambiente. Trabalhos têm demonstrado que os elementos ABRE não trabalham sozinhos, eles estão em muitos promotores acompanhados de “cis” elementos denominados elementos de acoplamento; essa combinação forma um complexo ABA responsivo (ABRC) que tem a capacidade de conferir o início de uma transcrição por indução via ABA (UNO et al., 2000).

O estudo de genes que respondem a desidratação em *Arabidopsis* tem reforçado o conhecimento da existência de rotas de transdução de sinais independentes de ABA (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000), isto comprovado pelo fato de que alguns genes induzidos por tratamento com ABA exógeno também são induzidos por condições de seca e frio em plantas mutantes ABA-deficientes (*aba*) e ABA-insensíveis (*abi*). Os genes de *Arabidopsis rd29A* e *rd29B* (*rd*- responsive to dehydration) respondem à seca, salinidade, frio e tratamento com ABA; e para a resposta a desidratação independente de ABA desses genes o elemento DRE é essencial. Vários genes possuem o *motif* DRE (TACCGACAT) em seus promotores e mais de 16 genes que contêm DRE ou um núcleo DRE (CCCGAC) foram relatados em promotores de genes de *Arabidopsis* que estão relacionados com os fatores de transcrição DREB1 e DREB2 (SEKI et al., 2002). Os fatores de transcrição denominados DREB pertencem a uma família de genes que agem na ativação de vários outros genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). O fator de transcrição DREB1A foi inserido em plantas de *Arabidopsis thaliana*, tabaco e soja juntamente com um promotor estresse-induzido e os resultados demonstraram um aumento da tolerância à seca, salinidade e frio nessas espécies (KASUGA et al., 2004; BENEVENTI, 2006).

As rotas de sinalização de estresse de déficit hídrico e frio incluem genes em comum além de genes que respondem somente a um ou outro tipo de estresse; entre eles estão os genes *rd*, *erd* (*early responsive to dehydration*), *cor* (*cold regulated*), *lfi* (*low-temperature induced*) and *kin* (*cold inducible*). Alguns desses genes foram superexpressos em plantas transgênicas aumentando a tolerância ao estresse e sugerindo que os produtos desses genes funcionam nos mecanismos de proteção dos organismos (VANDERAUWERA et al., 2007; SEKI et al., 2002; XIONG, 2002).

### 3.5 MECANISMOS FUNCIONAIS

As maiorias dos organismos, desde os micróbios, até os animais e plantas sintetizam solutos compatíveis em resposta ao estresse osmótico, essas moléculas são atóxicas e não interferem no metabolismo normal da célula; possuem papel na manutenção do turgor e estabilização da estrutura de proteínas da célula e podem estar relacionadas com a degradação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARTELS; SUNKAR, 2005). Entre essas moléculas estão os ciclitóis, prolina, glicina betaína, açúcares como a sacarose, hexose e trehalose; oligossacarídeos da família da rafinose (RFOS), proteínas protetoras como as aquaporinas e proteínas de choque térmico (HSPs), proteases e inibidores de proteínas, proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), lipídeos e ácido abscísico (ABA) (SEKI et al., 2007).

Estudos de fisiologia sugerem que carboidratos não estruturais como sacarose, hexose e açúcares alcoólicos se acumulam em condições de estresse em diferentes concentrações dependendo da espécie de planta. Os açúcares demonstram função de osmoprotector de macromoléculas específicas contribuindo com a estabilidade de estruturas de membrana e proteção de células durante a dissecação pela formação de cristais, os cristais agem preenchendo o espaço celular e evitando o colapso celular além de restringir a difusão de moléculas de reações químicas permitindo a manutenção de um estado quiescente (PHILIPS et al., 2002). A correlação entre acúmulo de açúcares e aquisição de tolerância tem sido relatada especialmente em experimentos de transgenia (TAJI et al., 2002;

GILMOUR et al., 2000). A trehalose tem sido relatada em estudos com animais fungos e bactérias como muito importante na sobrevivência a dessecação e sendo considerado o açúcar osmoprotetor mais eficiente em termos de mínimo de concentração requerida para ação protetora (ITURRIAGA et al., 2009). Em estudos de Crowe e colaboradores foi demonstrado que *in vitro* a desidratação e reidratação de membranas do retículo sarcoplasmático resultam na fusão de vesículas e perda da habilidade de transporte de cálcio, entretanto quando o açúcar trehalose esta presente em concentração equivalente à função dessas vesículas é preservada. Outros estudos também demonstram que açúcares protegem membranas *in vitro*, é sugerido que estas moléculas alteram as propriedades fisiológicas de membranas secas que se assemelham a biomoléculas inteiramente hidratadas (HANI; HEIDARI, 2008).

O acúmulo de prolina é um dos mais bem estudados mecanismos de resposta ao déficit hídrico em plantas. É o aminoácido mais rígido e coeso, que o diferencia dos demais; possui estrutura anelar e está relacionada com a diminuição do potencial hídrico. Esse aminoácido é sintetizado via glutamato e  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas reduções sucessivas, as quais são catalizadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS, EC 2.7.2.1) e P5C redutase (P5CR, EC 1.5.1.2) (YAMADA et al., 2005). Existe também a via dependente de ornitina pela enzima ornitina- $\delta$ -aminotransferase (OAT). O acúmulo de prolina nas plantas representa um mecanismo compensatório para a sobrevivência das plantas em períodos de estresse, agindo como regulador osmótico, protetor contra desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio, estabilizador da síntese de proteína, neutralizador de radicais livres, composição de proteínas estruturais da parede celular. Os níveis de prolina nas plantas antes de sofrerem um estresse são baixos, podendo variar de 1 a 5  $\mu\text{molg}^{-1}$  de matéria seca em muitas espécies como, arroz, sorgo, milho, trigo e cevada. Em condições de estresse este valor pode ser de 20 a 100 vezes maior (NOGUEIRA et. al., 2001).

Glicina betaína também é um soluto compatível muito estudado que age na proteção da planta mantendo o balanço hídrico entre a célula e o ambiente e estabilizando as macromoléculas. A tentativa de aumento do acúmulo de glicina betaína através de transgenia é desfavorável, resultados demonstram um baixo incremento nos níveis dessa substância e a não há aquisição de tolerância; o maior

fator limitante é a disponibilidade de colina que é substrato da reação e o transporte do cloroplasto onde é sintetizado para o citosol (CHEN; MURATA, 2002).

As proteínas LEA possuem função protetora em condições adversas, elas foram primeiramente identificadas em algodão onde a maioria dos RNA mensageiros transcritos em tecido embrionário representa algum tipo dessas proteínas, as características estruturais dessas proteínas são baseadas na composição de aminoácidos, que resulta em polipeptídios altamente hidrofílicos. Genes *Lea* codificam diversos grupos de proteínas de proteção ao estresse durante a maturação embrionária em todas as angiospermas (GOYAL et al, 2005). Essas proteínas não são normalmente expressas em tecidos vegetais, mas são induzidas por estresse osmótico ou aplicação exógena de ABA. Duas classes de proteínas LEA têm sido demonstradas como funcionais no mecanismo de tolerância ao estresse, *HVA1* pertencente ao grupo 3 de cevada, e *LE25* do grupo 4 de tomate. A superexpressão de *HVA1* em arroz demonstrou tolerância a seca e salinidade; já *LE25* foi expressa em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) conferindo tolerância a alta salinidade e congelamento. Uma importante proteína LEA conhecida como dehidrina, *RAB* ou *D-11* demonstra ter expressão induzida em condições de estresse durante a maturação de sementes; sua importância é atribuída a sua funcionalidade em diferentes rotas de tolerância, incluindo a atividade de chaperona (KOVACS et al., 2008; KALEMBRA; PUKACKA, 2007).

A desidratação requer modificações no fluxo de água nas células e tecidos que devem se adaptar as novas condições hídricas; esse fluxo é controlado pelo potencial aquoso que forma um gradiente que dirige o transporte e permeabilidade da água pela membrana. Estudos recentes têm demonstrado que as aquaporinas têm papel central e essencial nessa relação, elas facilitam a osmose por formar poros específicos como alternativa para a difusão da água pela bicamada lipídica e o aumento da permeabilidade da membrana (KALDENHOFF, 2008; TYERMAN et al, 2002). As aquaporinas pertencem a uma grande família de proteínas de membrana chamada *MIPs* (*Major intrinsic proteins*), em plantas quando presentes no tonoplasto são chamadas de *TIPs* (*Tonoplast intrinsic proteins*) e quando na membrana plasmática *PIPs*. Muitos trabalhos sugerem que genes que codificam aquaporinas são induzidos em condições de estresse osmótico. Destes, há um trabalho que demonstra a função das aquaporinas em manter o status aquoso através de estudos com uma aquaporina antisense em *Arabidopsis* e tabaco

(YAMAGUCHI-SHINOZAKI et al., 1992). Em *Arabidopsis* quando a expressão da aquaporina PIP1b é reprimida ela reage melhor em solução hipotônica comparada com plantas selvagens, isso é compensado pelo incremento do sistema de captação de água pela raiz (KALDENHOFF et al., 1998).

Existem proteínas que agem na manutenção da síntese e estrutura de outras proteínas, além da eliminação de proteínas não funcionais. Nessa função se enquadram as HSPs (*Heat Shock Proteins*) que pertencem uma família que abrange muitas chaperonas, que tem uma importante função em dobrar e unir proteínas durante a síntese, além de eliminar e degradar proteínas não funcionais. As HSP's são induzidas por estresse ambiental e estímulo de desenvolvimento, especialmente em condições de desidratação em muitas plantas; sendo que seu acúmulo coincide com a aquisição de tolerância ao estresse (CAMPALANS et al., 2001). Em plantas mutantes de *Arabidopsis* sensíveis a seca a expressão de HSP é reduzida, já em plantas transgênicas a superexpressão do gene *AtHSP17.7* acumula altos níveis da HSP *AtHSP17.7* e mostra aumento na tolerância a seca e salinidade (SUN et al., 2001). Uma das principais chaperonas da família das HSP pertence a família *HSP70* e é chamada de *BiP* (*Chaperone Binding Protein*); sua síntese é induzida por uma variedade de estresses ambientais, incluindo o déficit hídrico (BARLETS; SUNKAR, 2005).

A desidratação e salinidade trazem efeitos secundários prejudiciais as células como o acréscimo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem oxigênio singlete ( $O_2$ ), ânion radical superóxidos ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $HO^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) esses elementos podem ser extremamente reativos, ligados ao oxigênio atmosférico eles podem oxidar múltiplos componentes celulares como proteínas, lipídeos, DNA e RNA. Constantemente há produção de ROS em uma célula e a manutenção dos níveis são controlados, pois essas moléculas funcionam como sinalizadoras de respostas de defesa e aclimatação, mas em níveis extremos podem trazer efeitos deletérios graves podendo levar a morte da célula. Para eliminar ROS plantas possuem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os melhores mecanismos de eliminação incluem a superóxido dismutase (SOD), enzimas e metabólitos do ciclo da ascorbato-glutationa e catalase (CAT) (CARVALHO, 2008). Solutos compatíveis e proteínas estão envolvidas na limitação do dano e remoção de compostos tóxicos produzidas durante déficit hídrico, entre elas estão ubiquitinas, chaperonas e proteases. Os cloroplastos são os principais

sítios de produção de ROS, e em condições de seca seu aumento leva a inibição da habilidade de algumas proteínas em reparar danos no fotossistema II fator extremamente importante na manutenção da maquinaria fotossintética. Durante o déficit hídrico os níveis de ROS aumentam e enzimas como a superóxido desmutase, ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) atuam na eliminação de ROS e participam como agentes detoxificantes no processo de tolerância (MILLER, 2009).

### 3.6 TRANSCRIPTÔMICA

O seqüenciamento do primeiro genoma (bacteriófago  $\phi$ X174) iniciou a “Era Genômica”, que trouxe o conhecimento da seqüência completa de todos os genes de um organismo. Porém essas informações não foram suficientes para entender como esse genoma age no controle de processos biológicos dos organismos. O fato de células de diferentes tecidos de um mesmo organismo possuírem o mesmo genoma, mas apresentarem as mais variadas funções e morfologias ilustra a importância de estudar não só a seqüência dos genes, mas também a sua expressão e funcionalidade para podermos compreender as suas funções biológicas. Desta forma, em paralelo a disponibilização de dados genômicos, foram desenvolvidas outras técnicas para o estudo do genoma funcional, como a análise de transcritos de RNAm (análise de transcriptoma ou transcriptômica) e a análise do conjunto de proteínas expressas a partir do genoma (análise do proteoma ou proteômica) (PASSOS et al., 2009).

Toda a informação presente no genoma de um organismo é convertida em RNA que pode ser do tipo RNAr (ribossômico), RNAt (transportador), ou RNAm (mensageiro) incluindo os microRNAs e RNAi (de interferência). Os dois primeiros participam do aparato de tradução e os demais agindo em conjunto no controle da expressão gênica para controle das funções de um organismo. Sob condições de estresse, um grande número de genes é ativado enquanto outros são reprimidos (VAN DE MORTEL et al. 2007; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). O controle desta ativação/repressão ocorre em diferentes níveis, e

compreender como a expressão individual de genes contribui na resposta final em termos celulares, fisiológicos e agronômicos tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes (SHINOZAKI et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Dependendo da situação em que o organismo se encontra ele apresentará um diferente perfil de expressão. Recentemente, com o aumento da disponibilidade de sequências de dados genômicos, o perfil de expressão tem sido usado para identificar genes envolvidos na resposta adaptativa à seca e outros estresses abióticos e bióticos (HAZEN et al., 2005; RENSINK; BUELL, 2005).

A coleção completa de mRNAs transcritos em uma célula, tecido ou órgão em um momento particular é denominada de transcrito e o estudo dos mRNAs transcritos é denominado transcritômica (DALE; SCHANTZ, 2002). O estudo do transcrito de uma célula ou tecido representa o primeiro passo na caracterização funcional de genes de interesse. As metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais geralmente baseiam-se na geração de populações de cDNA a partir da população de mRNA expressa. O primeiro grupo de técnicas de análise de transcritomas baseia-se nas várias formas de acessar a quantidade de um transcrito específico em uma dada amostra em um determinado momento. Dentre as técnicas que compõem este grupo destacam-se os “Northern Blots” (ALWINE et al., 1977), Ensaio de Proteção de Ribonuclease (“Ribonuclease Protection Assay” ou RPA - MELTON et al., 1984; WINTER et al., 1985), Transcrição Reversa (“*Reverse Transcription*” ou RT) seguida de PCR em Tempo Real (“*Real Time RT-PCR*” - *TaqMan* - GIBSON et al., 1996) e Ensaio de Extensão de Iniciador (“*Primer Extension Assay*” - BOORSTEIN; CRAIG, 1989). O segundo grupo de técnicas se preocupa com a análise global de transcritos, entre essas técnicas é possível citar a Análise Serial da Expressão Gênica (“*Serial Analysis of Gene Expression*” ou SAGE - VELCULESCU et al., 1995), Seqüenciamento de Assinaturas Massivamente Paralelo (“*Massively Pararel Signature Sequencing*” ou MPSS - BRENNER et al., 2000) e Piroseqüenciamento (WEBER et al., 2007). Um terceiro grupo de técnicas abrange a comparação de diferentes transcritomas e a ciência envolvendo estas técnicas pode ser chamada de transcritômica comparativa. Neste grupo, destacam-se as técnicas *Differential Display* (LIANG; PARDEE, 1992), “*RNA fingerprinting*” (WELSH et al., 1992), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado baseado em cDNA (cDNA-AFLP - BACHEM et al., 1996), *GeneFishing*

(KIM et al., 2004), Hibridização Subtrativa (BAUTZ; REILLY, 1966; DIATCHENKO et al., 1996) e Microarranjos de DNA (SCHENA et al., 1995). Tais técnicas permitem isolar transcritos que sejam expressos em um dado tecido, fase do desenvolvimento ou condição, como, por exemplo, uma situação de doença sistêmica na planta, utilizando uma amostra controle como referência para comparação.

Estudos desenvolvidos com espécies modelo como *Arabidopsis*, *Medicago*, *Lotus* e tabaco, podem auxiliar na identificação de genes com função chave nos mecanismos de defesa em várias espécies já que os mecanismos envolvidos em respostas de defesa a estresses abióticos e bióticos tem sido identificados como apresentando várias etapas comuns nas rotas de sinalização molecular (KASUGA et al., 2004).

### 3.7 HIBRIDIZAÇÃO SUBTRATIVA SUPRESSIVA

A hibridização subtrativa é o um método de análise de expressão gênica capaz de enriquecer uma população de cDNAs com transcritos diferencialmente expressos. O método foi primeiramente utilizado por Bautz e Reilly (1966) para purificar o RNAm do fago T4. A técnica utiliza duas amostras de referencia uma que possui os transcritos de interesse que é chamada testadora (“*tester*”) e aquela utilizada como controle é chamada referência (“*driver*”). A amostra testadora geralmente vem de um tecido exposto a uma situação de estresse como um ambiente inadequado ou ataque de doença e a de referencia vem de um tecido submetido a condições normais ou ótimas. Existem variações no método de subtração, porém a teoria básica do método é a mesma para todos: após a extração do RNA total de ambas amostras o RNAm é isolado é convertido a cDNA, os quais são postos para hibridizar; as sequências híbridas são removidas e as restantes, não-hibridizadas, representam os genes que foram expressos na amostra testadora, mas não foram na amostra referência. Logo, estes são os transcritos diferencialmente expressos na condição experimental que se deseja estudar (DALE; SCHANTZ, 2002; JI; CAI, 2004).

As metodologias tradicionais de hibridização subtrativa são de uso limitado, porque elas requerem grandes quantidades de RNAm inicial e produzem

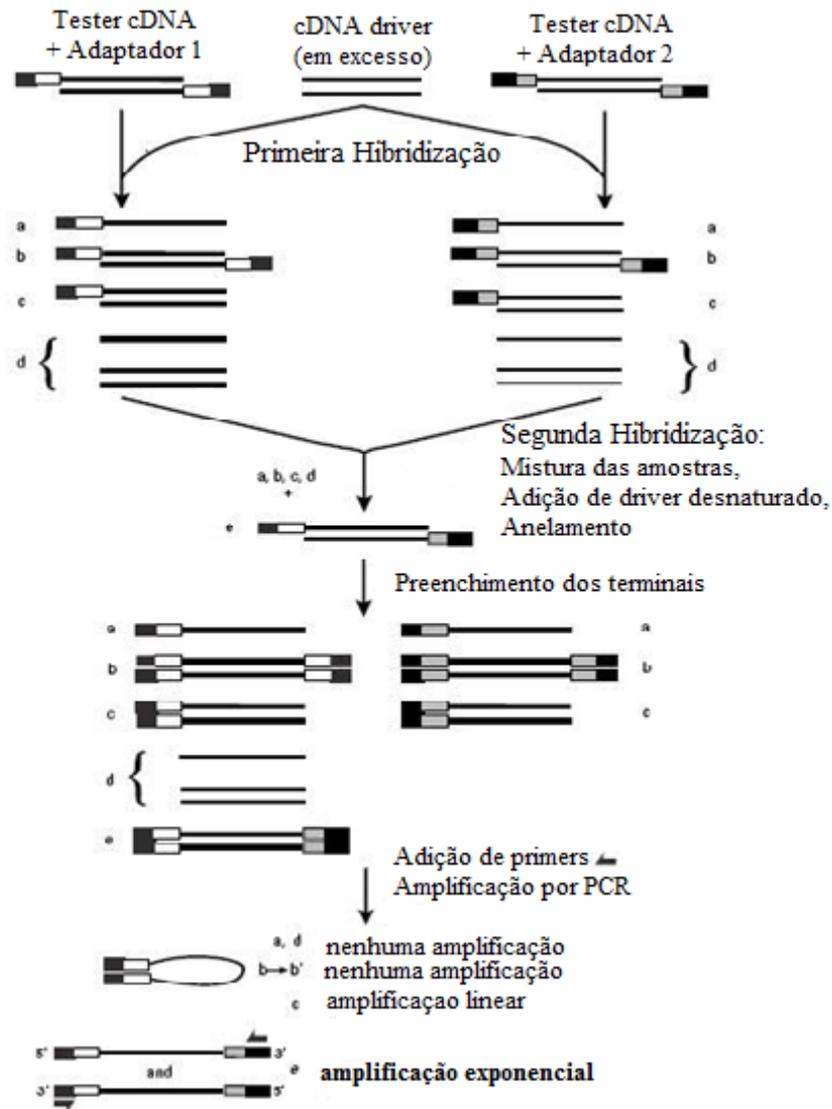
uma ínfima quantidade de cDNA ao final do processo, dificultando sua clonagem. A Hibridização Subtrativa Supressiva desenvolvida por Diatchenko e colaboradores em 1996 é um método baseado em PCR que contornou as limitações das técnicas anteriores, resultando em um enriquecimento de 1000 vezes na quantidade de transcritos diferencialmente expressos, sendo assim adequado à identificação de transcritos raros (JI; CAI, 2004).

Na SSH, o cDNA é sintetizado a partir de mRNA obtido das duas amostras que se pretende comparar: a testadora e a referência. A amostra testadora é subdividida em duas partes, sendo cada uma delas é ligada a um adaptador diferente (a sequência deste adaptador é complementar aos iniciadores que serão utilizados posteriormente para amplificação por PCR). Duas hibridizações são então realizadas. Na primeira, um excesso de cDNA referência é adicionado a cada amostra do testador. As amostras são então desnaturadas por calor e deixadas se complementar, gerando as moléculas tipo 'a', 'b', 'c' e 'd' em cada amostra (Figura 1). As moléculas tipo 'a' são significativamente enriquecidas com seqüências diferencialmente expressas, enquanto os cDNAs que não são diferencialmente expressos formam as moléculas tipo 'c' mediante complementação com o cDNA referência (DIATCHENKO e al., 1996).

Na segunda hibridização, as duas amostras da primeira hibridização são misturadas sem serem desnaturadas. Agora, somente os cDNA testadores unifilamentares subtraídos e equalizados podem se reassociar, formando um novo tipo de híbridos: as moléculas tipo 'e' (Figura 1). Após a segunda hibridização as moléculas residuais das populações 1 e 2 contendo os adaptadores 1 e 2, respectivamente, na extremidade 5', as extremidades 3' são completadas através da utilização de DNA polimerase I na presença de dNTP's. Ao completar essas moléculas, estamos adicionando às suas extremidades 3' o segmento complementar aos adaptadores presente na molécula complementar, estes novos híbridos serão amplificados por PCR, gerando a população de cDNAs enriquecida com seqüências diferencialmente expressas. As moléculas tipo 'a' e 'd' não podem ser amplificadas, por não possuírem o sítio de complementação dos iniciadores (Figura 1). As moléculas tipo 'c' possuem somente um sítio de complementação de *primer*, e são amplificadas linearmente.

A reação de polimerização em cadeia é denominada supressiva porque os fragmentos de cDNA que têm o mesmo tipo de adaptador (tipo b) em suas

extremidades são excluídos do processo de amplificação ao formar uma estrutura em alça, devido ao pareamento intramolecular das regiões complementares relativamente extensas, correspondentes ao adaptador, em ambas as extremidades. Quando as moléculas têm em suas extremidades os adaptadores 1 e 2, o trecho de complementaridade não é suficientemente longo para garantir a estabilidade dessa estrutura em alça. Para aumentar a eficiência do processo de amplificação das moléculas de cDNA diferencialmente expressas é feita uma segunda reação de PCR com *primers* que pareiam mais internamente nas moléculas-moldes (*nested* PCR.). A partir daqui as moléculas diferencialmente expressas amplificadas podem ser diretamente inseridas em um vetor de clonagem, o qual é adaptado para produtos de PCR, para a clonagem e obtenção de uma biblioteca subtrativa (DIATCHENKO; al., 1996) que depois de seqüenciada e analisada mostra informações importantes sobre a expressão gênica de um organismo na situação alvo.



**Figura 1** – Diagrama esquemático da SSH. Linhas sólidas representam os cDNAs digeridos com *Rsa* I. Caixas preenchidas representam a parte externa do adaptador 1 e 2R, que são idênticas e complementares ao iniciador da primeira PCR. Caixas vazias representam a parte interna do adaptador 1 e são complementares ao iniciador interno 1 da segunda PCR. Caixas sombreadas representam a parte interna do adaptador 2R e são complementares ao iniciador interno 2R da segunda PCR (BD BIOSCIENCES, 2004)

### 3.8 BIOINFORMÁTICA E SUA IMPORTÂNCIA NA ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

O conceito bioinformática possui muitos significados, de maneira prática ela refere-se ao estudo e entendimento do mundo biológico através dos

princípios e técnicas das ciências da informação, mundo este que vai desde as moléculas da vida, tais como DNA e proteínas, até englobar toda a biosfera. Como um significado aplicado a estudos de genética a bioinformática é o conjunto das técnicas advindas da matemática estatística e computação aplicadas a problemas de biologia molecular, em particular aos problemas da genômica e transcriptômica (SETUBAL, 2004). A bioinformática tem se tornado importante para o progresso científico e tecnológico nas diversas áreas da biologia e em especial no estudo do genoma que vem trazer informações que podem revolucionar o entendimento sobre o funcionamento dos organismos, trazendo vantagens como o melhoramento de plantas e controle de doenças.

As estratégias desenvolvidas visando entender a relação DNA, RNA e proteínas têm gerado uma enorme quantidade de informações, sendo que mais de três milhões de sequências de aproximadamente 200 espécies de plantas estão depositadas e disponibilizadas em bancos de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Essas sequências são geradas como alternativa para complementar o sequenciamento do genoma, auxiliando na descoberta de genes, anotação funcional e comparação de genomas (RUDD, 2003). Ferramentas computacionais têm otimizado a mineração de dados e o processo de descoberta e interpretação de informações contidas nessas sequências. A quantidade de dados sofre aumento constante exigindo recursos computacionais cada vez mais eficientes (NAGARAJ et al., 2006).

Bibliotecas de cDNA são construídas frequentemente, podendo conter milhares de clones de cDNA representantes da expressão de uma variedade de tecidos específicos em diferentes estágios de desenvolvimento ou situações desafio bióticas e abióticas; com isso o sequenciamento de ESTs associado à automação é uma ferramenta atrativa para explicar o transcriptoma.

Em consequência da grande quantidade de informações produzidas pelos projetos Genoma, Transcriptoma e Proteoma, o uso de banco de dados vem ganhando grande importância dentro da bioinformática. Um banco de dados é definido como uma coleção de dados interrelacionados; ele organiza e estrutura as informações de modo a facilitar consultas e atualizações de dados. Os bancos de dados mais utilizados em bioinformática são *Genbank* (Banco americano de seqüência de DNA e proteínas - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *EBI* (Banco de dados europeu de seqüência de DNA - <http://www.ebi.ac.uk/>), *DDBJ* (Banco de dados

japonês de seqüência de DNA - <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), *PDB* (banco de estruturas tridimensionais de proteínas - <http://www.rcsb.org/pdb>), *SWISS-PROT* (banco manual de proteínas e suas funções - <http://www.expasy.ch/spro/>), *INTERPRO* (banco de famílias, domínios e assinaturas de proteínas - <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), *KEGG* (Banco com seqüência de genomas de vários organismos e informações relacionadas a vias metabólicas - <http://www.genome.ad.jp/kegg/>). Os bancos de dados podem ser classificados em duas categorias: banco de seqüências primários e secundários; os primários são formados pela deposição direta de nucleotídeos, aminoácidos ou estruturas protéicas, sem qualquer processamento ou análise, inclui-se nessa categoria o *GenBank*. Bancos secundários, como *SWISS-PROT* utilizam informações derivadas dos bancos primários para adicionar informações a respeito de uma dada seqüência (PROSDOCIMI et al., 2001).

**ARTIGO**  
**“CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DOS  
PROCESSOS DE RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA”.**

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, cultura que é fortemente afetada por eventos de seca gerando grandes perdas e afetando diretamente a economia do país. Como cultura de grande importância na alimentação e produção de biocombustíveis é de grande interesse estudar maneiras de controlar o efeito desse estresse. Uma alternativa para contornar esse problema é o desenvolvimento de cultivares tolerantes, porém essa característica é controlada por uma grande variedade de genes impossibilitando a obtenção de plantas apenas pelos métodos convencionais de melhoramento. Os avanços na biotecnologia disponibilizaram o acesso ao genoma das plantas, com isso tornou-se possível analisar as modificações ocorridas na expressão gênica, que tornam uma planta mais ou menos tolerante a seca, durante eventos de deficiência hídrica. Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil transcricional de um cultivar de soja frente a diferentes níveis de estresse através da construção de bibliotecas subtrativas supressivas e estudar o comportamento de parâmetros fisiológicos de cultivares com diferentes níveis de tolerância. Para isso foi implantado um experimento de hidroponia em blocos casualizados com dois genótipos, sendo BR 16 e Embrapa 48, e aplicação de estresse no estágio V2 de crescimento. A análise dos parâmetros fisiológicos demonstrou comportamento diferenciado entre os cultivares ao longo do tempo de estresse e para ambos o tempo limite de estresse foi de 100 minutos, período em que a taxa fotossintética passa a ser nula. Foram construídas três bibliotecas subtrativas do genótipo BR 16: a primeira L1 referente a períodos entre 25 e 50 minutos de estresse, a segunda L2 entre 75 e 100 e a terceira L3 entre 125 e 150 minutos. O seqüenciamento das bibliotecas gerou uma grande quantidade de informações sendo que L1 conteve 1560 genes, L2 2009 genes e L3 3124 genes. Dentre os transcritos foram identificados genes referentes a importantes mecanismos de tolerância, como os fatores de transcrição DREB e MYB, ligados ao transporte de água e íons como as aquaporinas, genes participantes das rotas de síntese de solutos como prolina, rafinose, trehalose, entre outros importantes genes envolvidos em rotas metabólicas de tolerância a seca. Esses dados podem auxiliar no melhor entendimento de rotas e genes envolvidos nos processos de tolerância ao déficit hídrico e até mesmo na descoberta de novos genes participantes desses mecanismos.

**Palavras chaves:** *Glycine Max*. Expressão diferencial. Seca. Tolerância.

## 1 INTRODUÇÃO

A seca limita a produção das culturas e a distribuição das plantas por todo o mundo (GORANTLA et al., 2007), sendo responsável por perdas que podem alcançar até 50% da produtividade, ou chegar ao limite de perda total. Na economia dos últimos anos os dados mostram prejuízos de mais de 4 bilhões de dólares. Trabalhos mostraram que a seca modifica as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas, incluindo o fechamento estomático, a redução do crescimento e da fotossíntese e o aumento da respiração, que afetam consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (SHINOZAKI et al., 2003).

As plantas respondem e se adaptam a situações de estresse também nos níveis celular e molecular, principalmente pelo acúmulo de osmólitos e de proteínas envolvidas na tolerância ao estresse (UMEZAWA et al., 2006). Entretanto, as respostas das plantas à seca são complexas, envolvendo a expressão de genes que implicam na coordenação e na integração de múltiplas vias bioquímicas que contribuem para a aclimatação das plantas na condição adversa (BARRERO et al., 2006). Genes cuja expressão está aumentada durante a seca incluem aqueles que codificam enzimas chaves na biossíntese de ácido abscísico, proteínas envolvidas no ajuste osmótico e na proteção celular, inúmeras proteínas de sinalização celular, como quinases e fosfatases, além de fatores de transcrição (KIM et al., 2007).

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca é fundamental no planejamento de estratégias para o controle da intensidade do estresse e, conseqüentemente, para a adaptação das plantas a essa condição limitante (MATSUMURA et al., 2003). A aplicação de técnicas de análise de transcritos para o estudo da tolerância à seca tem trazido descobertas importantes dentro dos mecanismos bioquímicos e moleculares e, encontra-se em expansão para acompanhar o ritmo crescente das seqüências estudadas (MATSUMURA et al., 2005). Os mecanismos de tolerância à seca envolvem alterações na cascata de sinalização celular, que podem ser mediadas por mudanças transcricionais e pós-transcricionais (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Dentre as mudanças transcricionais, o maior desafio é

selecionar genes candidatos para serem estudados em detalhes entre os milhares de genes presentes no genoma. Dentro desse contexto a análise da expressão diferencial de genes através da construção de bibliotecas subtrativas supressivas é de grande importância, essa técnica permite a identificação de genes diferencialmente expressos e também de genes raros, além de permitir a comparação do perfil transcricional de bibliotecas obtidas a partir de tecidos submetidos a diferentes condições ambientais (JI; CAI, 2004), como por exemplo, comparar bibliotecas obtidas a partir de plantas submetidas a diferentes severidades de déficit hídrico.

Como um ponto inicial para entender as repostas desenvolvidas pelas plantas para tolerância à seca, foram medidos parâmetros fisiológicos para determinar os efeitos da seca em cultivares de soja tolerante e sensível, entre esses parâmetros fisiológicos estão taxa fotossintética, condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub>, transpiração, diferença de pressão de vapor, temperatura foliar em relação ao ambiente e eficiência fotossintética.

Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi a construção de bibliotecas subtrativas de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos de déficit hídrico, a fim de classificar os genes encontrados de acordo com sua função biológica e auxiliar no entendimento das rotas de resposta desenvolvidas para a tolerância a seca.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico foi obtido através de cultivo das plantas em sistema hidropônico. Foram selecionados dois cultivares contrastantes, sendo Embrapa 48 e BR 16, o primeiro considerado tolerante e o segundo sensível ao déficit hídrico (OYA et al., 2004, NEUMAIER et al., 2001).

Sementes dessas cultivares foram disponibilizadas pelo banco de Germoplasma da Embrapa-Soja. As sementes foram germinadas em papel de filtro umedecido com água destilada e mantidas em câmara climatizada sob 25°C e umidade relativa de aproximadamente 98%, (condições otimizadas pela circulação de vapor d'água), durante 5 dias para a obtenção de uma raiz de aproximadamente 10 cm de comprimento. Após a germinação as plântulas foram transplantadas para caixas azuis de 36 litros contendo solução nutritiva (HOAGLAND, 1950): 98mg. L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub>, 14 mg.L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>, 117mgL<sup>-1</sup> K, 80 mg.L<sup>-1</sup> Ca, 31 mg.L<sup>-1</sup> P, 32mg.L<sup>-1</sup> S, 24mg.L<sup>-1</sup> Mg, 0,02mg.L<sup>-1</sup> Mo, 0,1mg.L<sup>-1</sup> Mn, 0,13mg.L<sup>-1</sup> Cl, 0,01mg.L<sup>-1</sup> Cu, 0,25mg.L<sup>-1</sup> B e 0,025mg.L<sup>-1</sup> Zn.

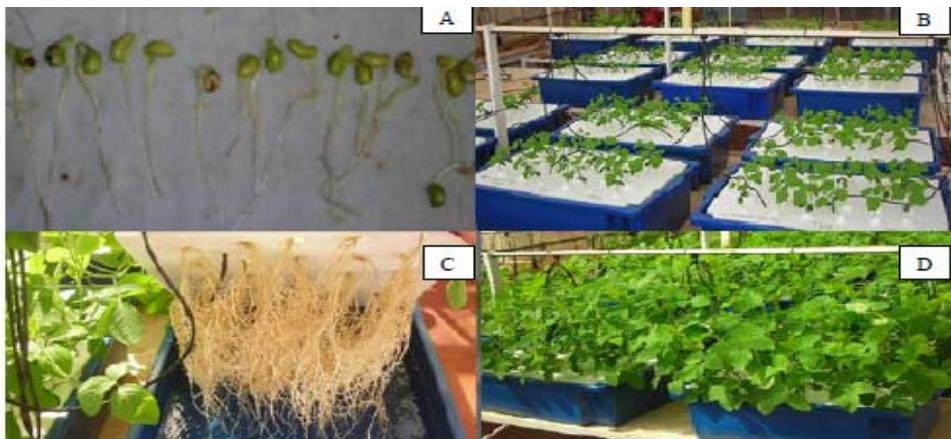
O Experimento foi realizado na sede da Embrapa Soja – Londrina Paraná do período de 16 de junho a 7 de julho de 2008. As plântulas se desenvolveram suportadas em placas de isopor, de modo que as raízes permaneceram em contato direto com a solução nutritiva. Durante o cultivo das plantas, o pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e a solução foi trocada semanalmente para manter os níveis adequados de nutrientes e garantir a manutenção do pH ótimo (pH 6,6) (HEWITT, 1983). Para disponibilizar oxigênio para as raízes a aeração foi mantida 24 horas por dia. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, com temperatura ambiente de 30 ± 5°C e umidade relativa entre 60 ± 20%. Lâmpadas incandescentes de 100 w foram utilizadas para suplementar a radiação natural e retardar o florescimento.

As plantas foram cultivadas sob condições ótimas de disponibilidade de nutrientes e oxigênio durante 22 dias, até o estágio de desenvolvimento V2, e posteriormente foram submetidas ao estresse por déficit hídrico, aplicado através do

esgotamento da solução nutritiva, e expondo as raízes a desidratação durante os tempos de indução. Condições controladas de temperatura e umidade relativa foram mantidas durante a aplicação do tratamento experimental. Foram realizados sete tratamentos de estresse:  $T_0$  (controle- sem estresse),  $T_{25}$  (25 minutos de estresse),  $T_{50}$  (50 minutos de estresse),  $T_{75}$  (75 minutos de estresse),  $T_{100}$  (100 minutos de estresse),  $T_{125}$  (125 minutos de estresse) e  $T_{150}$  (150 minutos de estresse). O tecido foliar foi coletado e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido.

## 2.2 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA

Durante a aplicação de estresse seis plantas de cada cultivar e de cada tratamento de estresse foram submetidas a avaliações dos seguintes parâmetros fisiológicos: taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), temperatura ambiente ( $^{\circ}\text{C}$ ), temperatura foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ), diferença da temperatura ambiente e da temperatura foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ) e diferença de pressão de vapor baseado na temperatura foliar (kPa); as medidas foram realizadas com o equipamento portátil de medição de fotossíntese LI-6400 (*Portable Photosynthesis System*) usando o folíolo mediano do segundo nó foliar (do ápice em relação à base) completamente expandido.



**Figura 2 –** A - Sementes germinadas em papel de filtro, demonstrando o tamanho da plântulas na implantação do experimento. B – plantas em estágio V1. C – raízes crescendo em solução nutritiva. D – Plantas em estágio V3 prontas para coleta.

### 2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MÉTODOS DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso (COCHRAN; COX, 1957), com os tratamentos dispostos em esquema fatorial: dois genótipos (tolerante – Embrapa 48 e sensível – BR 16), sete níveis de estresse (0 - sem estresse, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 minutos sob estresse), e três blocos. Cada nível de estresse foi representado por 30 plantas, sendo 10 em cada bloco que foram consideradas repetições biológicas (R1, R2 e R3) totalizando 210 plantas por genótipo e 420 no experimento.

Os dados obtidos para os parâmetros fisiológicos foram submetidos a análise exploratória para verificar se as pressuposições de normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965), independência dos erros (PARENTE, 1984), aditividade do modelo (TUKEY, 1949), e homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972) dos tratamentos estavam presentes nos dados. Posteriormente realizou-se análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SANEST (ZONTA et al., 1982) e SAS (*Statistical Analysis System*) versão 8.0 (SAS Institute, 2001); as comparações múltiplas de médias para os tratamentos do modelo foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,5\%$ ). A confecção de gráficos foi realizada com auxílio do *Microsoft Office Excel 2007*.

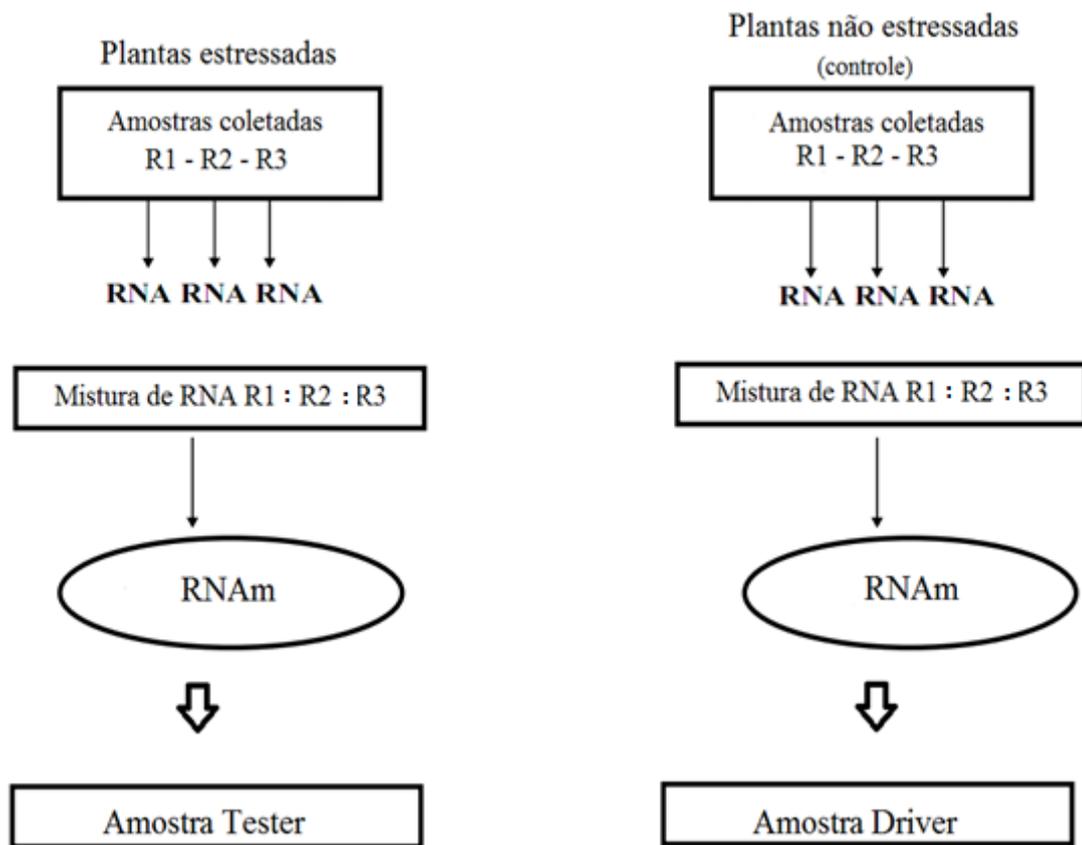
### 2.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ISOLAMENTO DE RNAM POLY-A

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) que é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. As amostras do RNA total extraído foram usadas para isolamento do RNAm, o qual foi composto através da formação de *bulks* de cada tratamento e repetição (Figura 03). De cada repetição foi utilizada uma determinada alíquota para compor um *bulk* de 250 µg de RNA total e assim possibilitar que todas contribuíssem com a mesma quantidade de RNA total.

O isolamento de mRNA Poly-A foi realizado utilizando o kit *Fast Track*<sup>®</sup> MAG (Invitrogen). Este procedimento se baseia na captura do mRNA Poly-A utilizando *primers* oligo (dT) biotinilados para hibridizar em solução com a região da

cauda Poly-A do mRNA. Os híbridos são capturados usando estreptavidina acoplada a partículas paramagnéticas que se ligam ao *primer* biotilado, quando colocados em um separador magnético para serem lavados sob alta estrigência separando os demais tipos moléculas. O mRNA é eluído a partir da fase sólida adicionando-se água deionizada livre de RNase.

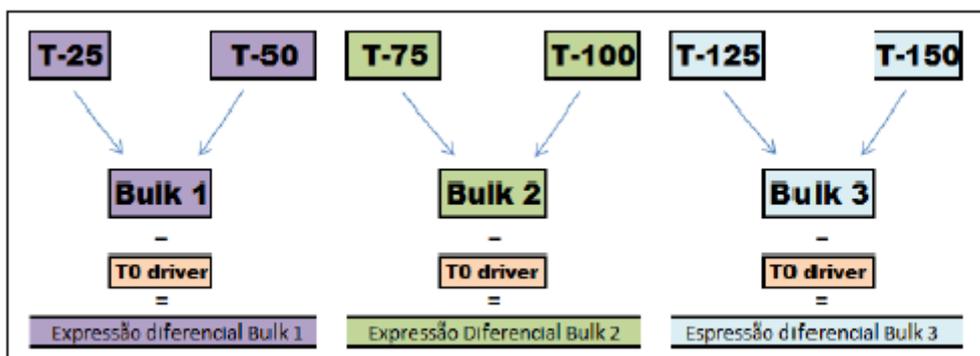
Após isolamento, o mRNA foi quantificado por espectrofotometria para avaliação da qualidade e quantidade de material purificado e submetido à eletroforese em gel de agarose corado com 1% EtBr para verificar a eficiência do isolamento do RNAm Poly-A.



**Figura 3** – Modelo esquemático para a formação dos *bulks* usados no isolamento do mRNA Poly-A. Amostras dos diferentes tempos de estresse foram coletadas em triplicata R1, R2 e R3 e tiveram seu RNA extraído separadamente. Para o isolamento de RNAm foi feito mix com a mesma quantidade de RNA total de cada repetição. Os RNAm obtidos foram utilizados através da formação de *bulks* para servirem de amostras *tester* (plantas estressadas) e amostra *driver* (plantas controle) na construção da biblioteca.

## 2.5 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA SUBTRATIVA

As bibliotecas subtrativas foram construídas a partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNAm utilizando o *Kit PCR-Select™ cDNA Subtraction* (Clontech - Palo Alto, CA, EUA). As amostras *tester* de cada *bulk* foram obtidas pela união de 1  $\mu\text{g}$  de RNAm de cada tratamento (tempo sob condições de estresse), sendo o *bulk 1* composto por 1  $\mu\text{g}$  de RNAm dos tempos T25 e T50, o *bulk2* dos tempos T75 e T100 e o *bulk 3* de T125 e T150 minutos de estresse. O tratamento controle T0 (*driver*) foi utilizado para normalizar cada biblioteca (Figura 3). A técnica de hibridização subtrativa supressiva utiliza populações submetidas a diferentes tratamentos utilizando um como controle que quando comparada a uma população testadora exclui sequências idênticas para se obter apenas moléculas diferencialmente expressas. O processo de subtração utiliza a hibridização entre sequências similares para excluir genes expressos em ambos os tratamentos (*tester* e *driver*). Neste trabalho, as bibliotecas foram construídas para obter genes expressos apenas sob condições de déficit hídrico, ou seja, no sentido —*forward*”.



**Figura 4** – Montagem dos *bulks* de mRNA para a síntese das bibliotecas subtrativas. Uma quantidade equimolar de mRNA de cada amostra inicial foi utilizada para montar os *bulks* que serviram como molde (*tester*) para a construção das bibliotecas. O processo de subtração foi realizado pela adição do mRNA proveniente das plantas do tratamento controle - sem estresse (T0 *driver*). Os *bulks* 1, 2 e 3 representam respectivamente as bibliotecas subtrativas L1, L2 e L3.

### 2.5.1 Síntese e Digestão de cDNA

Para iniciar a síntese da primeira fita de cDNA 2µg de mRNA *tester*, *driver* e controle foram acrescidos de cDNA *Synthesis Primer* em tubo estéril e completados com água para um volume final de 5µl, após mistura o material foi incubado a 70°C em termociclador por dois minutos e colocado no gelo por mais dois minutos para alinhamento do *primer*, após foram adicionados 2µl de 5X *First Strand Buffer*, 1µl de dNTP's mix (10mM), 1µl de água estéril e 1µl de AMV *Reverse Transcriptase* (20unidades/µl). O conteúdo foi misturado em vortex e incubado a 42°C por uma hora e meia para síntese, posteriormente o material foi transferido para incubação no gelo para inativação da enzima.

Para a síntese da segunda fita foram adicionados à reação 48,4µl de água, 16µl de 5X *Second Strand Buffer*, 1,6µl de dNTP mix (10mM) e 4 µl de 20X *Second-Strand Enzyme Cocktail*, que contém um mix de DNA *Polimerase*, RNase H e *Escherichia coli* DNA Ligase. O conteúdo foi misturado e incubado a 16°C por duas horas em termociclador e após adicionou-se 2µl de T4 DNA Polymerase (6U) e novamente incubado a 16°C por 30 minutos. Para finalizar a síntese foram adicionados 4µl de 20X EDTA/*Glycogen mix*. Para obtenção da fase líquida com material solubilizado foram adicionados 100µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) que foram misturados e centrifugados e após coleta da fase superior o repetiu-se o processo com 100µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Para a precipitação foram utilizados 40µl de 4M NH<sub>4</sub>OAc e 300µl de etanol 95%. Após centrifugação o pellet foi lavado com etanol 80% e o pellet foi dissolvido em água estéril livre de DNase. O material foi quantificado em espectrofotômetro (nanoDrop) e qualificado em gel de agarose corrido em baixa voltagem.

A digestão foi realizada com todos os tratamentos visando gerar fragmentos mais curtos e com extremidades abruptas para otimizar a subtração que requer a ligação de adaptadores nessas extremidades. A digestão é necessária para evitar que ocorra nas etapas posteriores a amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes. Além disso, a cinética de hibridação de fragmentos menores é mais homogênea, pois, evita a formação de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e permite que um mesmo gene seja representado por diversos fragmentos na biblioteca, aumentando sua probabilidade de ser clonado.

Nesse sentido a digestão foi realizada com a enzima Rsa I (10unidades/ $\mu$ l) que reconhece a sequência de DNA 5'-GTAC-3'.

### 2.5.2 Ligação de Adaptadores

Apenas as amostras “*tester*” foram divididas em duas populações e cada uma foi ligada a diferentes adaptadores. Esse processo é essencial para a hibridização e para a amplificação exponencial de seqüências diferencialmente expressas, já que os adaptadores têm seqüências complementares aos iniciadores que são usados na amplificação. Para a ligação dos adaptadores, uma alíquota de 1 $\mu$ l de amostras de cDNA provenientes de cada “*bulk*” foi diluída em 5 $\mu$ l de água estéril (cDNA *tester* diluído). Em seguida as amostras foram ligadas separadamente aos dois tipos de adaptadores (adaptador 1 e adaptador 2R), preparando-se as seguintes misturas de reação:

Mistura de reação “*tester 1*”: foram adicionados a 2 $\mu$ l de amostras cDNA *tester* diluída, 2 $\mu$ l de adaptador 1 (10 $\mu$  mol.L<sup>-1</sup>), 3 $\mu$ l de água, 2 $\mu$ l de tampão de ligação (5X) e 1  $\mu$ l de T4 DNA ligase (400 unidades/ $\mu$ l). Mistura de reação “*tester 2*”: os mesmos componentes da mistura de reação 1 adicionando-se adaptador 2R (10 $\mu$  mol.L<sup>-1</sup>) ao invés do adaptador 1. O material foi misturado e incubado *overnight* a 16°C e após o período de incubação foi adicionado 1 $\mu$ l de EDTA/*Glycogen* mix para finalizar a reação e levado para aquecimento a 72°C por 5 minutos para inativar a enzima ligase.

### 2.5.3 Hibridização

Para a primeira hibridização foram utilizadas as amostras “*tester*” ligadas ao adaptador 1 e 2R e as amostras de cDNA “*driver*” digeridas. O cDNA “*driver*” foi adicionado a cada amostra “*tester*” e para iniciar a hibridização foram acrescidos tampão de hibridação (4X). As misturas foram aquecidas, a 98°C, por um minuto e meio, para desnaturação das amostras, em seguida a hibridação foi

incubada a 68°C por oito horas. Após esse passo foi iniciada imediatamente a segunda reação de hibridização. Os cDNAs remanescentes na primeira hibridização (viáveis para a segunda hibridização) são altamente enriquecidos por sequências diferencialmente expressas, pois os cDNAs não alvo presentes nas amostras “*tester*” e “*driver*” são hibridizados.

Na segunda hibridização as populações ligadas a diferentes adaptadores são misturadas, moléculas com a mesma sequência ligada cada uma com um adaptador diferente se unem gerando a amostra para PCR de amplificação de seqüências diferencialmente expressas.

#### 2.5.4 Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os cDNAs diferencialmente expressos nas plantas presentes no produto da segunda reação de hibridização foram amplificados seletivamente por PCR. Na PCR de amplificação apenas seqüências diferencialmente expressas ou seja, moléculas com os dois tipos de adaptadores em suas extremidades, são exponencialmente amplificadas por PCR de supressão. A segunda PCR, também chamada de *nested* PCR reduz o *background* e enriquece a população com seqüências diferencialmente expressas.

## 2.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os produtos de PCR de cada biblioteca foram preparados para a clonagem *in vitro* e a subsequente reação de sequenciamento. Cada biblioteca foi marcada com uma *tag* específica para posteriormente identificar a origem das seqüências. As amostras foram sequenciadas com a tecnologia Solexa (Illumina) aplicadas em uma canaleta do sequenciador *Genome Analyzer GAII* utilizando *single reads* e gerando fragmentos de aproximadamente 36 pb.

A montagem do transcriptoma e as análises *in silico* foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Genômica e Expressão (LGE -

<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/soja/>) da Unicamp-SP parceira do projeto GenoSoja. A construção do banco de dados da soja, para servir como genoma referência, foi realizada utilizando os dados depositados no banco de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) do *National Center Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os dados do genoma da soja disponibilizados pelo *DOE Joint Genome Institute* (JGI - <http://www.jgi.doe.gov/>).

As sequências (*reads*) produzidas foram ancoradas no genoma referência com auxílio do programa SOAP - *Short Oligonucleotide Alignment Program* (LI et al., 2008) usando parâmetros que permitiram o alinhamento com no máximo dois mismatches entre as sequências. O programa EDENA – *Exact DE Novo Assembler* (HERNANDEZ et al., 2008) foi utilizado para montagem das sequências mapeadas no genoma em *contigs*, com base nos parâmetros pré-definidos do programa.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

A análise dos parâmetros fisiológicos avaliados mostrou que após 100 minutos de déficit hídrico todos os parâmetros chegaram ao limite de estresse, levando as variáveis a níveis incompatíveis com as médias comuns em condições normais água. A taxa fotossintética teve um ligeiro aumento para ambas cultivares no início da aplicação do estresse e passou a ser negativa a partir de 125 minutos. O cultivar Embrapa 48 considerado tolerante a seca teve taxas maiores que o cultivar sensível nos períodos de T0 (controle) e T25; já em 75 minutos BR 16 obteve taxa superior a Embrapa 48 e nos demais tempos os cultivares tiveram médias sem diferenças significativas. Dentro do cultivar BR 16 os tempos 25 e 50 minutos tiveram taxas fotossintéticas semelhantes e superiores ao controle, já partir de 75 minutos houve queda igualando-se ao tempo controle e posteriormente acompanhado de queda constante. Embrapa 48 e BR 16 tiveram médias fotossintéticas do tempo T50 igual ao controle T0 e para Embrapa 48 os períodos T75 e T100 também apresentaram médias iguais (Figura 5A).

A condutância estomática (*gs*) sofreu decréscimo constante e foi sempre maior para Embrapa 48, sendo que para os dois cultivares o período de decréscimo acentuado foi no período de 100 minutos de estresse assim como ocorreu com a taxa fotossintética e transpiração. Para o cultivar Embrapa 48 *gs* foi estatisticamente igual de T0 a T50, seguida de queda em T75 e permanecendo a partir de T100 em níveis semelhantes até 150 minutos. Em BR 16 a *gs* teve aumento significativo em T50 e sofreu rápido decréscimo a partir de 75 minutos de estresse permanecendo em níveis basais de T100 a T150 (Figura 5B).

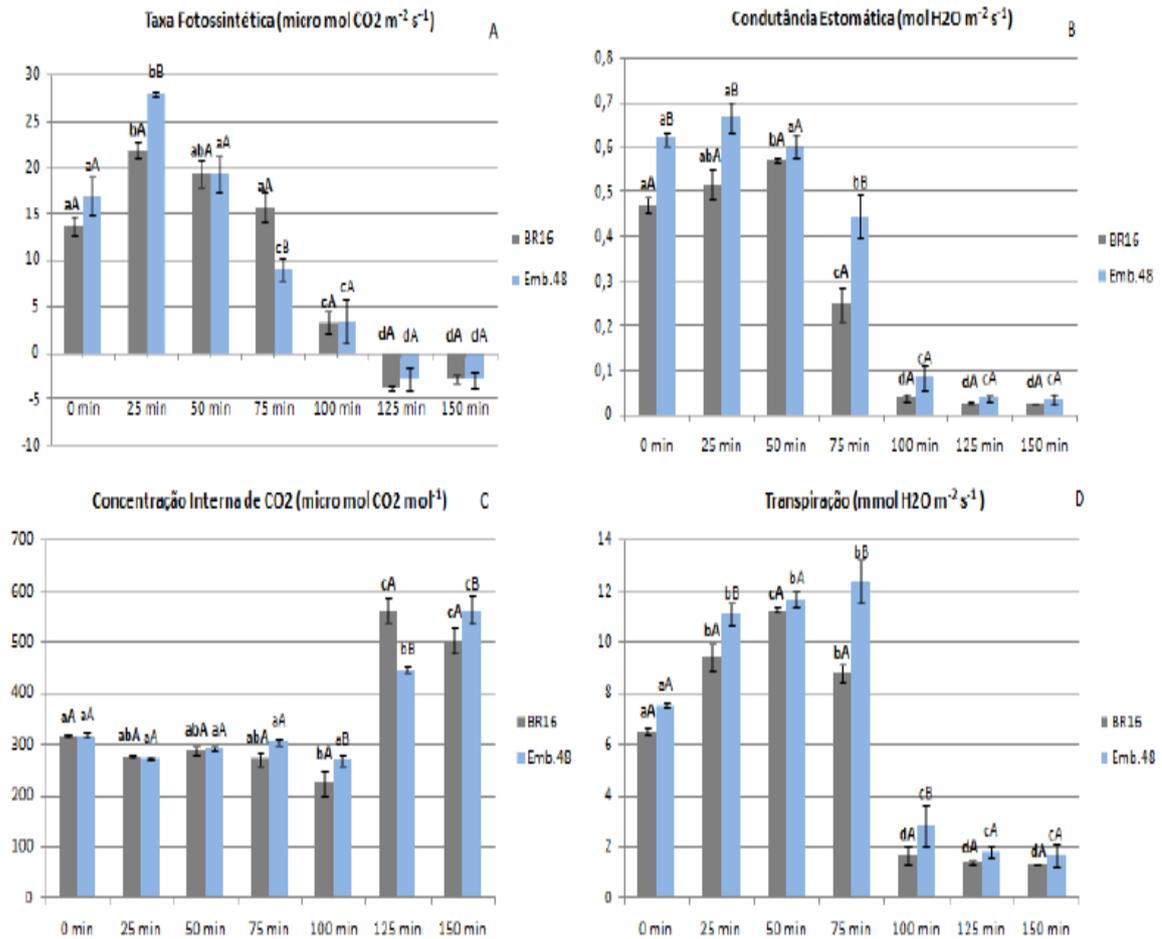
Os cultivares tiveram níveis de concentração interna de CO<sub>2</sub> controlados e estatisticamente iguais até 75 minutos após início do estresse ocorrendo aumento significativo em 125 minutos que foi mantido em 150 minutos. A partir de 100 minutos os cultivares começaram a se comportar de maneira diferenciada, sendo que Embrapa 48 teve maior acúmulo de CO<sub>2</sub> em 100 e 150 minutos de estresse e BR16 em 125 minutos (Figura 5C).

A taxa de transpiração de Embrapa48 foi sempre maior que de BR16, apesar de não ser diferente significativamente nos tempos 0, 50, 125 e 150 minutos. O cultivar BR16 teve sua taxa de transpiração acompanhando a evolução da condutância estomática, já Embrapa48 teve um aumento gradativo até 75 minutos após início da aplicação de estresse e queda acentuada a partir de 100 minutos. BR16 também apresentou queda acentuada a partir de 100 minutos de estresse, porém sua queda se iniciou em 75 minutos assim como ocorreu com a  $G_s$  (Figura 5D).

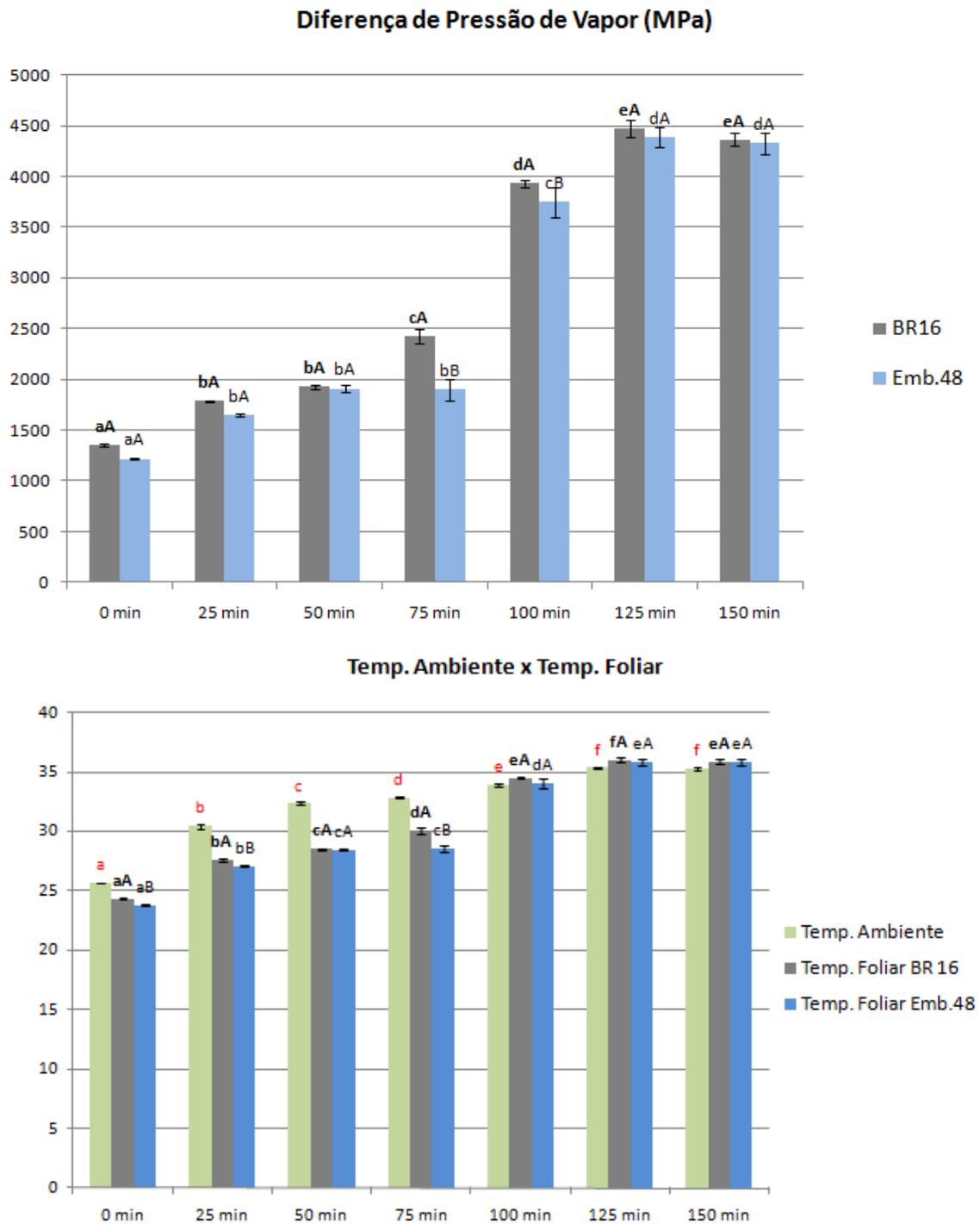
A temperatura do ambiente durante o estresse foi monitorada e apresentou mínima de  $25,6^{\circ}\text{C}$  e máxima de  $35,4^{\circ}\text{C}$ . Assim como a temperatura do ambiente, a temperatura foliar também foi monitorada e as diferenças entre estes parâmetros foram avaliadas. A cultivar sensível teve a temperatura foliar superior em todos os tempos de estresse apesar de não ser significativa estatisticamente. As temperaturas predominantes durante cada tratamento experimental diferiram entre si, porém, quando avaliado a influência da temperatura do ambiente na temperatura foliar pode ser observado que após o tratamento T75 minutos, a temperatura foliar aumentou significativamente nestas plantas sob condições de estresse tornando-se superiores a temperatura ambiente (Figura 6B).

A partir de 100 minutos de estresse a diferença de pressão de vapor (DPV) aumentou chegando a valores máximos em 125 e 150 minutos de estresse, picos que coincidiram com os períodos em que a  $G_s$  e transpiração foram menores. O cultivar sensível teve DPV maior durante toda a aplicação do estresse (Figura 6A).

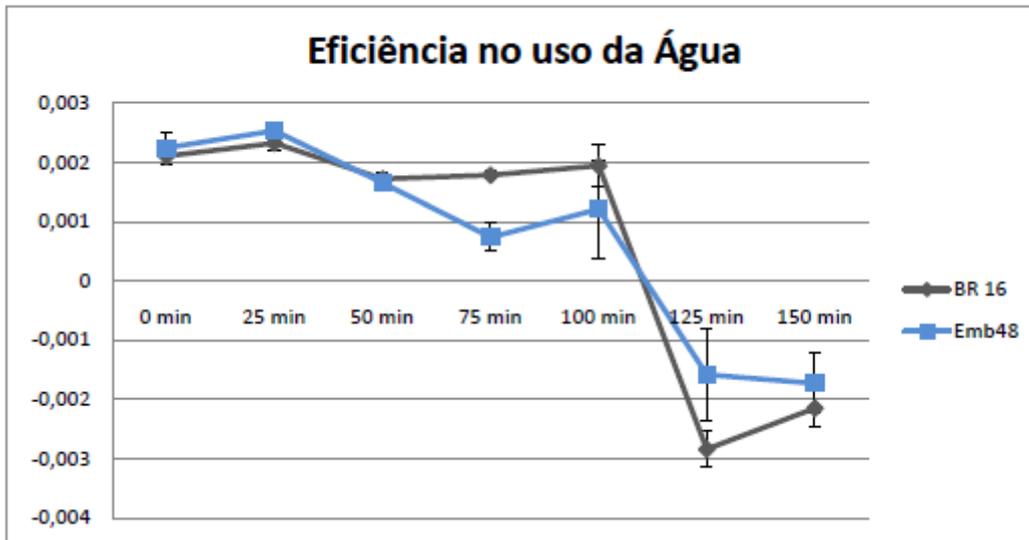
Para avaliar a eficiência fotossintética dos cultivares foram realizados cálculos de razão de transpiração e eficiência, Embrapa 48 foi mais eficiente nos períodos T0 e T25 e BR 16 nos demais tempos. Como a partir de 125 minutos a taxa fotossintética foi negativa para os cultivares, os valores não podem ser comparados em relação a eficiência, os dados são demonstrados apenas para ressaltar a ligeira queda da fotossíntese durante a aplicação do estresse (Figura 7).



**Figura 5** – Média de Parâmetros Fisiológicos dos Cultivares BR-16 e Embrapa48 submetidos ao déficit hídrico, os valores apresentados são valores de teste de médias para tempo de aplicação de estresse e cultivar (Teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ ). Figura 5A: taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), Figura 5B: condutância estomática ( $\text{mol HO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), Figura 5C: concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), Figura 5D: taxa de transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão; as letras maiúsculas demonstram diferenças entre os cultivares dentro de cada tempo e as minúsculas demonstram as diferenças entre os tempos dentro de cada cultivar; letras iguais não apresentam diferença estatística observadas pelo teste de Tukey



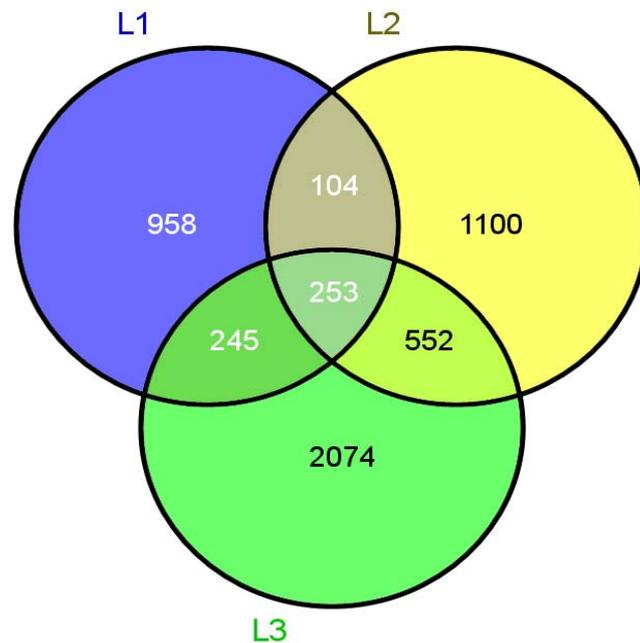
**Figura 6 –** Média de Parâmetros Fisiológicos dos Cultivares BR-16 e Embrapa48 submetidos ao déficit hídrico, os valores apresentados são valores de teste de médias para tempo de aplicação de estresse e cultivar (Teste de Tukey com  $p \leq 0,05$ ). Figura 6A: Diferença de pressão de vapor (MPa). Figura 6B: Temperatura ambiente x Temperatura Foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão; as letras maiúsculas demonstram diferenças entre os cultivares dentro de cada tempo e as minúsculas demonstram as diferenças entre os tempos dentro de cada cultivar; letras iguais não apresentam diferença estatística observadas pelo teste de Tukey.



**Figura 7** – Curva de eficiência do uso de água ao longo dos tempos de aplicação de estresse para os cultivares BR 16 e Embrapa 48.

### 3.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DE BIBLIOTECA SUBTRATIVA E *BLAST*

As bibliotecas obtidas a partir de amostras do cultivar BR 16 foram seqüenciadas e montadas, já as do cultivar Embrapa48 encontram-se em etapa de montagem. A partir do sequenciamento das bibliotecas subtrativas de BR 16 foram obtidos milhões de *reads* que foram alinhadas no genoma referência da soja pelo programa SOAP e montadas pelo Edena formando 5286 *contigs*, sendo 1560 representantes da biblioteca L1 (*bulk* de 25 e 50 minutos sob estresse), 2009 de L2 (75 e 100 minutos de estresse) e 3124 de L3 (125 e 150 minutos de estresse). Os “*contigs*” montados compreendem seqüências de 100 a 1600 pb, sendo que as seqüências menores que 100pb foram descartadas. Aproximadamente 84% dos “*contigs*” de cada biblioteca foram mapeados no genoma da soja. O conjunto de “*contigs*” foi comparado entre si para verificar as seqüências comuns e as seqüências pertencentes exclusivamente a cada biblioteca, conforme mostra a Figura 8.



**Figura 8** – Número de seqüências obtidas nas bibliotecas subtrativas de folha do cultivar BR 16. L1 representa a biblioteca obtida por plantas submetidas a estresse de 25 e 50 minutos; L2 representa a biblioteca de plantas submetidas a estresse de 75 e 100 minutos e L3 de 125 e 150 minutos. Partes sobrepostas no gráfico representam seqüências comuns entre as diferentes bibliotecas.

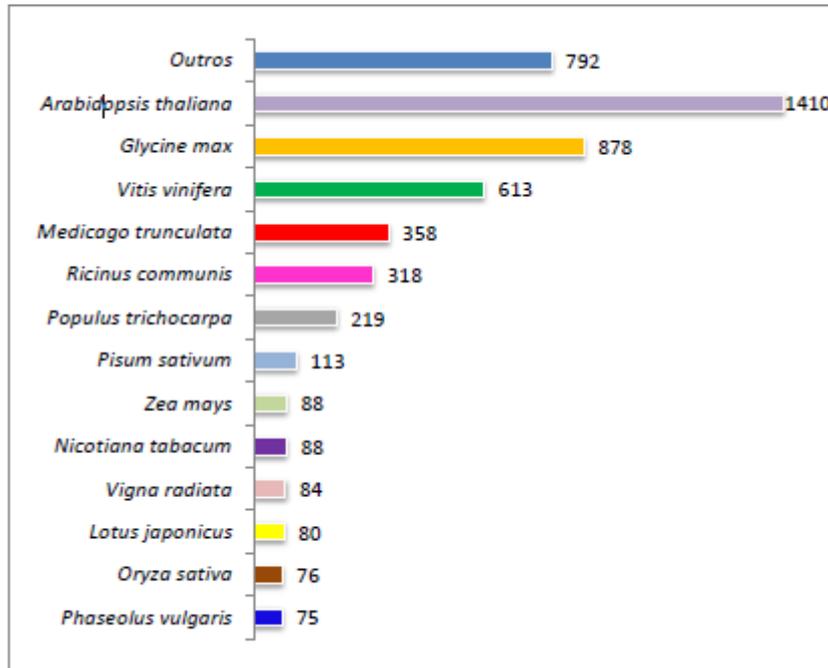
Foi observado um aumento gradativo do número de seqüências nas bibliotecas representantes de estágios mais avançados do estresse, chegando ao máximo em L3 que representa o tempo máximo de estresse.

A anotação automática apresentou mais de 50% das seqüências sem identidade com genes conhecidos, porém a re-anotação manual reduziu esses números consideravelmente, isso ocorre, pois a anotação automática considera apenas o primeiro resultado do *blast* com maior similaridade mesmo que seja uma proteína desconhecida, hipotética ou não nomeada. Já a anotação manual seleciona o melhor resultado e compara com outros bancos de dados para a tomada de decisão; no caso foram feitas comparações com o *Gene Ontology*. A tabela 2 resume os dados de anotação para o conjunto de *contigs* de cada biblioteca.

**Tabela 2** – Número e porcentagens de sequências conhecidas e desconhecidas após anotação automática e Manual dentro das bibliotecas do cultivar BR-16 submetido a estresse hídrico.

Total de contigs	Anotação Automática		Anotação Manual	
	conhecidas	desconhecidas	conhecidas	desconhecidas
L1 (958)	340 (35,49%)	618 (64,51%)	767 (80%)	191 (20%)
L2 (1100)	437 (39,72%)	663 (60,28%)	918 (83,45%)	182 (16,55%)
L3 (2074)	592 (28,54)	1482 (71,46%)	1699 (81,92%)	375 (18,08%)
L1/L2 (104)	63 (60,58%)	41 (39,42%)	86 (82,70%)	18 (17,30%)
L1/L3 (245)	111 (45,31%)	134 (54,69%)	226 (92,24%)	19 (7,76%)
L2/L3 (552)	289 (52,35%)	263 (47,65%)	475 (86,05%)	77 (13,95%)
L1/L2/L3 (253)	142 (56,13%)	111 (43,87%)	241 (95,25%)	12 (4,74%)

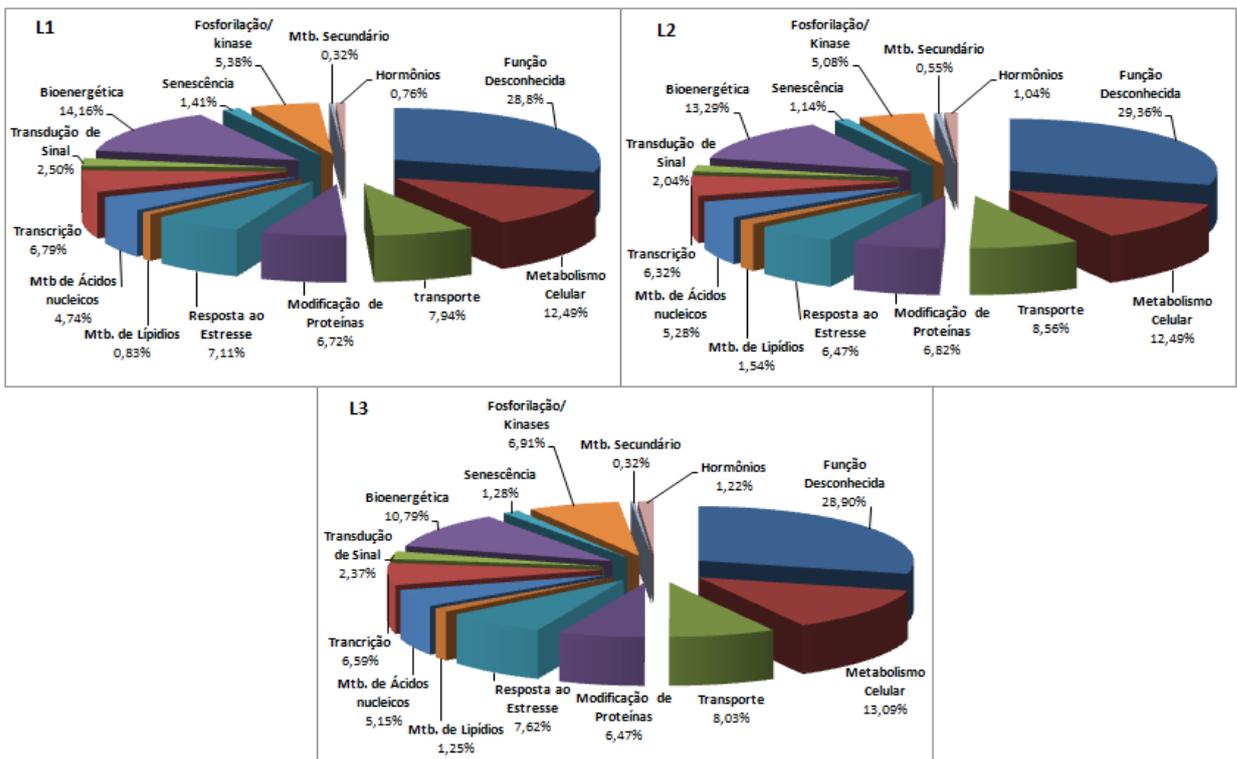
A maior parte das sequências consultadas na base de dados nr (não redundante) do *GenBank* foi similar a acessos de plantas. Várias de espécies de plantas foram representadas nas bibliotecas, das quais a mais abundante foi *Arabidopsis thaliana* (1410 sequências), seguido de *Glycine max* (843 sequências), *Vitis vinifera* (613 sequências), *Medicago truncatula* (358 sequências), *Ricinus communis* (318 sequências), *Populus trichocarpa* (219 sequências), *Pisum sativum* (113 sequências), *Zea mays* (88 sequências), *Nicotiana tabacum* (88 sequências), *Vigna radiata* (84 sequências), *Lotus japonicus* (80 sequências), *Oryza sativa* (76 sequências), *Phaseolus vulgaris* (75 sequências) entre outros organismos (792 sequências) que incluem diferentes tipos de plantas, animais e microorganismos (Figura 9).



**Figura 9** – Espécies mais representadas entre os similares encontrados no NCBI e GenBank para as seqüências das três bibliotecas e os respectivos números de similares encontrados.

As planilhas obtidas através da consulta nos bancos de dados trazem informações sobre nome do gene e sua atuação compreendendo função molecular, componente celular e processo biológico em que determinado gene atua. Com essas informações foi possível agrupar um conjunto de genes com função semelhante, ou seja, categorizar as bibliotecas. A categorização inicial disponibilizou um número muito grande de categorias que foram agrupadas para obtenção de um gráfico mais explicativo já que determinadas categorias faziam parte da mesma rota funcional. Após agrupamento obtiveram-se 14 categorias a primeira contém genes com função desconhecida onde estão inseridos os novos genes, a categoria metabolismo celular contém genes responsáveis pela síntese de componentes celulares, enzimas comuns do metabolismo celular como hidrolases e transferases além de reguladores do ciclo celular; na categoria transporte estão inseridas as proteínas de canal como as aquaporinas e vesículas do complexo de golgi; em modificação protéica estão incluídas as chaperonas e enzimas responsáveis pela proteólise e ubiquitinação. Dentro da categoria estresse estão genes envolvidos nos processos de resposta a diferentes estresses como salinidade, frio, calor, seca,

patógenos e oxidação; já em transcrição estão incluídas as RNA polimerases e fatores de transcrição como DREB, NAC, MYB entre outros. A categoria transdução de sinais abriga genes como calmodulinas e *GTP-binding proteins*; em bioenergética estão incluídos genes responsáveis pela obtenção de energia através do metabolismo de carboidratos, fotossíntese e respiração celular. Na categoria senescência estão genes responsáveis pelo envelhecimento e morte celular, dentro de fosforilação/kinase estão diversas proteínas kinases que participam de uma grande variedade de processos e agem também na resposta ao estresse. Finalmente a categoria hormônios, que inclui auxina, giberelina e ABA tão importantes para o desenvolvimento e sinalização. O Figura 10 ilustra as categorias e a porcentagem de genes pertencente a cada uma delas dentro de cada biblioteca.



**Figura 10** – Categorização das bibliotecas L1(25 e 50 minutos de estresse), L2 (75 e 100 minutos de estresse), L3 (125 e 150 minutos de estresse). Gráficos obtidos pela descrição dos processos biológicos ou função molecular (GO) obtidos através de análises no GeneOntology.

Categorias funcionais importantes nos processos de resposta ao estresse hídrico foram obtidas, como categorias que abrigam genes relacionados a

percepção, sinalização e resposta ao déficit hídrico. Para localizar os genes expressos na cultivar BR16 relacionados com déficit hídrico foram realizadas pesquisas na literatura de genes relatados com o processo de resposta ao déficit hídrico para confirmar a presença ou ausência de determinado gene nas diferentes bibliotecas. Foram observadas sequências relacionadas à percepção e transdução de sinais de estresse como WD40, quinases de histidina, MAPK, quinases dependentes de cálcio, fosfolipase C, calmodulina (Tabela 3).

**Tabela 3** – Genes relacionados a percepção e transdução de sinais de estresse, os dados demonstram as bibliotecas em que os genes foram encontrados e o número de vezes em que aparecem.

Percepção e Transdução de Sinais	L1	L2	L3	TOTAL
WD40	9	6	12	27
quinases de histidina	4	2	8	14
MAPK	1	9	9	19
CDPK (Kinases dependente de Ca)	8	7	12	27
Fosfolipase C	1	1	1	3
Fosfolipase D	2	3	9	14
CBL	1	5	6	12
Receptores de Cálcio	3	2	2	7
Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)		4	1	5
Calmodulin	3	2	6	11
RPK	5	6	10	21
<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>47</b>	<b>76</b>	<b>160</b>

Em todas as bibliotecas observaram-se diferentes tipos de fatores de transcrição totalizando 171 sequências correspondentes, dentre esses importantes fatores relacionados ao déficit hídrico foram identificados, como genes da família DREB, NAC, WRKY, Bzip, MYB (*Myeloblastosis oncogenese*), MYC (*Myelocytomatosis oncogene*), bHLH (*Basic Helix-loop-helix protein*) entre outros como detalhados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Fatores de transcrição encontrados nas bibliotecas, os dados demonstram as bibliotecas em que esses apareceram e o número de sequências similares com esses fatores dentro das bibliotecas.

Fator de Transcrição	L1	L2	L3	TOTAL
Família DREB e relacionados	9	10	14	33
NAC	13	17	17	47
WRKY	5	10	15	30
MYC		2	6	8
MYB	11	6	16	33
Bzip	8	3	14	25
HDzip	1	3	3	7
c2h2	2	4	4	10
Seringolide	4	2	7	13
bHLH	4	1	13	18
Domínios dedo de zinco		2	4	6
HD-homeobox	2		2	4
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>115</b>	<b>234</b>

Genes relacionados à resposta ao estresse como reguladores osmóticos, protetores celulares e transportadores de íons e água foram detectados nas bibliotecas tendo diferenças quantitativas e qualitativas entre elas, com base no número de transcritos representados em cada uma. Foi realizada uma categorização manual desses genes por função: transporte de água e íons, ajuste osmótico e proteção celular, eliminação de ROS e outras categorias (Tabela 5).

**Tabela 5 –** Sequências relacionadas a transporte de água e íons, ajuste osmótico e proteção celular, detoxificação e outros tipos de sequências relacionadas a resposta ao estresse hídrico encontrados nas bibliotecas L1, L2 e L3 e o número de similares encontrados em cada biblioteca.

Transporte de água e íons	L1	L2	L3	TOTAL
Aquaporinas	5	14	17	36
MIP/TIP (família aquaporinas)			3	3
<b>Ajuste Osmótico, Proteção Celular</b>				
RFO			1	1
trehalose 6-phosphate			5	5
P5C		3		3
LEA	1		2	3
erd (LEA)	1	1	10	12
HVA (LEA)	1			1
RAB (LEA)	3	3	9	15
HSP (chaperona)	5	7	14	26
BIP (HSP)		2	1	3
chaperonas	3	1	5	9
Quinases	59	61	193	313
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>92</b>	<b>260</b>	<b>430</b>
<b>Eliminação de ROS</b>				
SOD (superóxido dismutase)			1	1
Glutathione redutase	1	1		2
APX			1	1
peroxidases	8	8		16
ubiquitin	32	39	38	109
catalase	2	3		5
Cytochrome p450	22	8	10	40
glycosyl transferase	8	2	2	12
nadph	2	2	10	14
<b>Outros tipos de sequências</b>				
G-box (motif de ligação ABRE)		1	1	2
LHT			1	1
axh	1			1
rubisco		3	2	5
f-box		10	6	16
NADH desidrogenase		1	3	4
UDP-AcetilGlucosamina Pirfosforilase			1	1
transportador de prolina			3	3
AAP (permease)		3		3
<b>TOTAL</b>	<b>151</b>	<b>144</b>	<b>141</b>	<b>236</b>

## 4 DISCUSSÃO

O déficit hídrico afeta a bioquímica, fisiologia, morfologia e os processos de desenvolvimento das plantas, reduzindo a fotossíntese de diferentes maneiras como pela redução da difusão do CO<sub>2</sub> para dentro da folha e pela redução da habilidade dos cloroplastos para fixar o CO<sub>2</sub> que neles penetra. O estresse hídrico causa, em curto prazo, reduções na condutância estomática e no crescimento de folhas e, em longo prazo, reduções no crescimento do caule das plantas e diferenciação das raízes para melhor captação de água (CHAVES, 2009; JALLEL et al., 2007; BARTELS; SUNKAR, 2005).

Todas as mudanças ocorridas em uma planta durante o déficit hídrico é resultado de um conjunto de fatores de ordem molecular e genética. Plantas com diferentes cultivares reagem de diferentes maneiras a condições de estresse. Analisando parâmetros fisiológicos, como taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração, entre outros, em plantas submetidas a regimes deficientes de irrigação ou expostas a eventos de seca podem auxiliar na inferência sobre o nível de tolerância, ou não, destas plantas ao estresse. Uma planta considerada sensível também reage a mudanças no ambiente e procura se proteger, porém plantas tolerantes parecem resistir mais tempo as condições estressantes. Comparar cultivares tolerantes e sensíveis quanto a parâmetros fisiológicos e diferenças na expressão gênica ao longo de um determinado período de estresse pode auxiliar na elucidação os mecanismos chave utilizados por uma planta para reagir ao déficit hídrico e auxiliar no desenvolvimento via melhoramento e engenharia genética de plantas mais tolerantes e que suportem as constantes mudanças climáticas.

Comparando o comportamento dos cultivares Embrapa 48 e BR 16 durante o déficit hídrico aplicado, podemos observar que em alguns parâmetros fisiológicos as plantas se comportaram de maneira semelhante (Figura 5 e 6). O cultivar tolerante manteve, em média, funções vitais como fotossíntese, condutância estomática e transpiração em níveis mais elevados durante o estresse, mesmo que em alguns períodos essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

A partir das análises do comportamento fisiológico dos cultivares pode-se constatar que as plantas mantiveram a taxa fotossintética, condutância

estomática, taxa de transpiração, temperatura foliar e diferença de pressão de vapor até 75 minutos após aplicação do estresse de desidratação direta das raízes, sendo que a partir de 100 minutos após o início de estresse ocorreu uma queda significativa nesses parâmetros, sugerindo que esse período foi o limite tolerável de estresse (Figura 5 e 6). Todos esses fatores têm ligação com o fechamento estomático, pois diminuindo a  $G_s$  diminui as trocas gasosas, processo que influencia na fotossíntese, na transpiração, na temperatura foliar e na pressão de vapor. Como em ambos cultivares o fechamento estomático efetivo ocorreu após 100 minutos sob condições de estresse, os demais fatores acompanharam esse padrão.

Uma das primeiras linhas de defesa contra a seca é a redução da área foliar que ocorre pela contração e afrouxamento da pressão de turgidez contra a parede celular desencadeada pela falta de água nas células. Com a diminuição da área foliar a transpiração diminui e a planta consegue manter um suprimento de água limitado no solo por um período mais longo (JALLEL et al., 2009). Isso pode explicar o fato de Embrapa 48 ter mantido sua transpiração em níveis elevados por mais tempo que BR 16, por ser mais tolerante ela consegue manter por mais tempo sua área foliar. O fechamento estomático compreende outra linha de defesa contra o estresse. Este mecanismo é controlado por sinais químicos enviados pelas raízes até a parte aérea e estão diretamente relacionados com o status hídrico do solo. A fotossíntese é menos sensível ao decréscimo da turgidez, portanto não apresenta resposta efetiva em estresse hídrico moderado (CHAVES et al., 2009). O processo fotossintético é alterado de forma mais significativa após períodos mais prolongados de estresse explicando o fato dessa taxa ter aumentado ou se mantido até 75 minutos após a exposição das raízes a desidratação, a partir de 100 minutos o estresse passou a ser severo e a fotossíntese caiu rapidamente (Figura 5A).

De acordo com a Figura 5B e 5C observou-se que à medida que a condutância estomática diminuiu a concentração interna de  $CO_2$  aumentou. Estas modificações podem estar relacionadas com o fechamento estomático durante os estádios iniciais do estresse hídrico e o aumento da eficiência no uso da água, o que permite que uma quantidade maior de  $CO_2$  seja absorvida por unidade de água transpirada, concluindo, portanto, que o fechamento estomático inibe mais a transpiração do que diminui as concentrações intercelulares de  $CO_2$ . Porém em estresse rigoroso, a desidratação de células do mesófilo inibe a fotossíntese, o metabolismo do mesófilo é prejudicado e a eficiência do uso da água decresce. A

partir de 100 minutos de estresse a concentração interna de  $\text{CO}_2$  aumentou, isso pode ter ocorrido pela paralização da fotossíntese que acumulou o  $\text{CO}_2$  nos tecidos (CHAVES et al., 2009; STRECK, 2003).

A condutância estomática também foi inversamente proporcional à diferença de vapor de pressão (DPV) e à temperatura foliar. De acordo com a literatura, a DPV pode estimular respostas nos estômatos contra a perda de água, isso poderia acontecer através de dois mecanismos propostos: a hipótese de *feedforward* diz que a condutância estomática ( $G_s$ ) diminui diretamente com o aumento da DVP, com o ácido abscísico sendo o sinal para a resposta; na segunda hipótese, denominada *feedback* ou retroalimentação, a  $G_s$  diminui com o aumento do DVP devido ao aumento na transpiração foliar, o que abaixa o potencial de água na folha. Estes dois mecanismos têm sido objeto de debates na comunidade científica, pois existem resultados publicados na literatura que suportam ambas as hipóteses (STRECK, 2003). Nas análises fisiológicas realizadas foi demonstrado que o déficit hídrico faz a DVP aumentar (FIGURA 5A) e com isso os estômatos (FIGURA 5B) podem se fechar para evitar a perda de água pela transpiração (FIGURA 5D) e, conseqüentemente, ocorrer o aumento a temperatura foliar.

A temperatura foliar ( $T_{\text{foliar}}$ ) é resultante de como uma planta com suas características fisiológicas e morfológicas consegue controlar o balanço de energia. A manutenção de processos fisiológicos das plantas está diretamente ligada à temperatura foliar, sendo que o aumento excessivo desse fator pode paralisar os processos celulares ou até mesmo levar a destruição de tecidos, sendo letal a planta. Pequenas diferenças de temperatura podem representar grandes diferenças sobre as taxas fotossintéticas, respiratórias e outras atividades bioquímicas da folha (SAGE; KUBIEN, 2007). Em nosso trabalho, foi observado um aumento gradativo na  $T_{\text{foliar}}$  ao longo do estresse e essa temperatura superou a temperatura ambiente concomitantemente à redução da condutância estomática e taxa de transpiração (Figura 6B). Em plantas com sistema fotossintético C3, como a soja, a temperatura ótima, definida pela temperatura em que os valores de fotossíntese chegam a 90% da capacidade fotossintética, está entre 15 e 30°C (LARCHER, 2000). Assim, neste experimento, a temperatura foliar atingiu 35,9°C, possivelmente em função do estresse hídrico aplicado e também por influência do aumento da temperatura ambiente. Esse aumento da temperatura foliar pode ter sido um dos colaboradores para a diminuição da taxa fotossintética a valores

negativos, demonstrando que a partir de 100 minutos sob condições do estresse aplicado o fechamento dos estômatos e diminuição da transpiração influenciaram no aumento da temperatura.

A eficiência no uso de água observada para ambos os cultivares apresentou nos períodos iniciais taxas compatíveis com as encontradas nas plantas C3 (Figura 7) (RIPLEY et al., 2010), o ligeiro aumento nessa eficiência justificou o aumento significativo da taxa fotossintética (Figura 5A). O cultivar tolerante teve melhor eficiência apenas no período controle T0 e em T25, ou seja, em condições normais de disponibilidade hídrica e em ligeiros estados de déficit. Esse fato pode ter ocorrido, pois é nítido nos gráficos 5B e 5D que a condutância estomática e consequentemente a transpiração de Embrapa 48 mantiveram-se mais altas em relação ao cultivar sensível durante toda a aplicação do estresse. A eficiência no uso de água é dada pela recíproca da razão de transpiração que é a divisão da taxa transpiratória pela taxa fotossintética (TAIZ; ZAIGER, 2009), como Embrapa 48 manteve valores de condutância estomática e transpiração mais elevados durante o estresse ela perdeu mais água que é o fator base para o cálculo de eficiência.

Após análise do conjunto de dados obtidos pelos parâmetros fisiológicos foi constatado que os dois cultivares se comportaram com o mesmo padrão, apresentando quedas e aumentos de parâmetros nos mesmos tempos de estresse e em muitos pontos sem diferenças significativas. Isso demonstra que o nível de tolerância de um cultivar não pode estar baseada apenas pela análise de parâmetros fisiológicos, estudos mais apurados, como as respostas moleculares ao estresse, são necessários para definir a tolerância ou não de determinado cultivar.

As respostas de uma planta a determinado estresse abiótico estão associadas à ativação de diversas rotas metabólicas de defesa. O presente trabalho visou a identificação de transcritos ativados durante o déficit hídrico para compreender como uma planta responde ao déficit hídrico e elucidar as vias de transdução de sinal que ativa tais respostas. Nesse contexto, utilizamos a técnica de SSH para obtenção de transcritos relacionados ao déficit hídrico excluindo genes responsáveis por funções normais da célula, os chamados mantenedores da casa ou *housekeeping* que tem expressão constante ao longo do desenvolvimento da planta, assim como genes expressos em condições normais de disponibilidade de água.

A cultivar de soja BR 16, utilizada neste estudo, foi avaliada quanto a sua produtividade em condições de campo durante eventos de seca, sendo considerada sensível ao déficit hídrico, com base em análises de parâmetros fisiológicos, morfológicos e de produção de grãos (OYA et al., 2004), como a atribuição de sensibilidade desse cultivar tem apenas fundamentação de observações fisiológicas e de rendimento de produção, sua análise molecular pode confirmar essa qualidade ou pode trazer descobertas que alterem essa denominação. Quando comparamos o perfil transcricional de genes de um cultivar tolerante em relação a um sensível podemos visualizar as principais diferenças qualitativas e quantitativas entre elas e assim identificar genes que efetivamente contribuem para a tolerância de um determinado cultivar. Portanto conhecer a resposta de um genótipo sensível pode ser de grande valia nos processos de descoberta de genes importantes nas rotas de tolerância permitindo a comparação de níveis de expressão e presença e ausência de determinado gene (GUO et al., 2009; BARTELS; SUNKAR, 2005).

A montagem das bibliotecas de folha de BR 16 submetidas a déficit hídrico: L1 (25 e 50 minutos de estresse), L2 (75 e 100 minutos de estresse) e L3 (125 e 150 minutos de estresse) demonstrou um perfil enriquecido com genes responsivos a seca conhecidos na literatura além de sequências desconhecidas (*no hits, unknown, unnamed, hypothetical*) passivas de estudo funcional dentro da rede de resposta ao estresse. A riqueza de genes responsivos à seca, constatados nessas bibliotecas, mostra que a tolerância ao déficit hídrico pode não está relacionada apenas com a qualidade, ou seja, com os genes presentes em um genótipo, mas possivelmente com o nível (quantidade) de expressão desses genes. A cultivar BR 16 pode possuir uma grande variedade de transcritos relacionados a rede de resposta a seca, mas é possível que os níveis de expressão desses genes não sejam suficientes para que ele tenha as mesmas respostas de um cultivar tolerante.

Categorias funcionais diretamente relacionadas ao déficit hídrico foram obtidas, como a denominada resposta ao estresse que abriga genes que respondem diretamente a resposta a seca e outros tipos de estresse como salinidade e frio, isso ocorrendo, pois um mesmo gene pode atuar em diferentes tipos de estresse (WISNIEWSKI et al., 2008). Outras categorias como transporte, transdução de sinal, hormônios e fosforilação/ kinases, também são importantes para os mecanismos de resposta a seca. Os genes identificados classificados nas

categorias funcionais incluem genes conhecidos nas rotas de tolerância a seca. Comparando as diferentes bibliotecas observamos que todas elas abrigaram as 14 categorias, e as porcentagens de cada uma foi semelhante. Isso pode ter ocorrido, pois a categorização foi manual e uniu diferentes tipos semelhantes em uma mesma categoria. As porcentagens levam também em consideração o total de genes das bibliotecas, inferindo que entre eles houve uma maior diferença quantitativa do que qualitativa, ou seja, os mesmos genes foram encontrados nas diferentes bibliotecas, porém em números crescentes conforme a severidade do estresse.

Transcritos relacionados à percepção e sinalização celular foram expressos durante todo o período de estresse aplicado, ou seja, do tratamento T25 a T150 minutos (Tabela 2). Proteínas que atuam na percepção do sinal extracelular, relatadas neste trabalho como histidina quinase fosforilam reversivelmente as proteínas ativando grandes e complexas cascatas de transdução de sinais que envolvem receptores de cálcio, Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), espécies reativas de oxigênio e ABA (BARTELS; SUNKAR, 2005).

Diferentes tipos de MAPK também foram identificadas nas bibliotecas, incluindo MAPK, MAPKK e MAPKKK essas formam uma cascata comum em rotas de sinalização em células eucariotas incluindo as plantas (BARTELS; SUNKAR, 2005). A fosforilação é o maior mecanismo de controle de funções celulares em resposta a sinais externos; a ativação de MAP kinases requer a fosforilação de resíduos de aminoácidos que ativam um circuito específico de MAP kinases (MAPKK). A cascata de MAPK inclui a ativação de MAPK citoplasmáticas que induz a translocação para o núcleo onde essas quinases são capazes de fosforilar fatores de transcrição (NING et al., 2009). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas 20 MAPK, 10 MAPKK e 60 MAPKKK (ICHIMURA et al., 2002). O número de MAPKinases existentes mostra que rotas não são únicas e muitos desses genes podem responder a diferentes tipos de estresse. Um exemplo está relacionado à AtMPK6 e AtMPK3 que são ativados por estresse osmótico e os ortólogos em tabaco SIPK (*salicylic acid-inducible protein kinase*) e WIPK (*wound-inducible protein kinase*) são ativados também por estresse bióticos indicando um ponto de convergência de diferentes cascatas de sinalização para execução de respostas apropriadas. De fato, uma mesma MAPK pode participar de diferentes eventos de sinalização e podem ser ativadas por diferentes tipos de estímulos (SINGH et al, 2002; TENA et al., 2001). Em alfafa dois tipos distintos de quinases

são ativados por estresse osmótico moderado ou intenso sugerindo a existência de diferentes sensores para estresse moderado e extremo em plantas (BARTELS; SUNKAR, 2005; MUNNIK; MEIJER, 2001).

As fosfolipases C e D encontradas participam no processo de modificações estruturais dos fosfolipídios de membrana durante o estresse e funcionam como mensageiros secundários de sinalização. (MUNNIK; MEIJER, 2001). Frank et al. (2000) isolaram dois cDNAs de fosfolipase D (PLD) expressos em condições de déficit hídrico que estão envolvidos na resposta precoce à desidratação, através da produção de um segundo mensageiro, o ácido fosfotídico, que amplia o sinal após a percepção do estresse.

O cálcio é um importante sinalizador durante a desidratação e estresse salino, em células de plantas ele funciona como um mensageiro secundário que amplia a rede de estímulos extracelulares. Diferentes estímulos extracelulares ativam sinais de cálcio específicos sendo que a ativação, amplitude e duração desses sinais dependem da natureza e intensidade do estímulo. Classes de sensores de  $Ca^{2+}$  têm sido caracterizadas em plantas, dentre essas classes estão as calmodulinas, CDPKs, e CBLs (*calcineurin B-like proteins*) (YANG; POOVAIAH, 2003). Proteínas CDPK induzidas por estresse osmótico têm sido relatadas em diversas plantas, elas apresentam múltiplas funções nem rotas de transdução de sinais respondendo as modificações nos níveis de  $Ca^{2+}$  induzindo varias respostas fisiológicas. Além de sua função sinalizadora estudos sugerem que algumas CDPKs estão relacionadas com os movimentos de abertura e fechamento de estômatos que estão diretamente ligados a resposta ao estresse hídrico (MORI et al., 2006). Como pode-se observar na tabela 3 diferentes MAPKs e receptores de cálcio foram detectados entre as bibliotecas comprovando a importância dessas proteínas sinalizadoras na resposta a seca também para os cultivares estudados. A biblioteca L1 que corresponde aos primeiros tempos de estresse abrigou os receptores de cálcio, demonstrando que o cálcio possui resposta rápida a situação de estresse.

Entre os transcritos identificados há importantes fatores de transcrição, os quais representam um dos principais mecanismos de controle da expressão de genes (Tabela 3). São conhecidos vários fatores de transcrição que respondem ao déficit e cuja importância tem sido comprovada pelo uso na transformação genética de plantas. Em plantas de arroz foi inserido o fator de transcrição AP37, da família APETALA2 (AP2) pertencente a mesma família do fator

de transcrição AtDREB2A, que foi superexpressado, sob controle do promotor constitutivo *OsOc1* (OH et al., 2009). Em trabalho realizado por Beneventi (2006) a inserção do gene *AtDREB1A*, que codifica o fator de transcrição DREB1A, proporcionou o aumento da tolerância nas plantas transgênicas em relação a plantas controle. O gene codificante do fator de transcrição WRKY11 foi inserido por Wu et al. (2008) em arroz e também resultou em plantas mais tolerantes à seca e calor.

Muitos genes que codificam fatores de transcrição estão envolvidos na cascata de transdução de sinal e são ativados por desidratação: como MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), CDPK (*Calcium-Dependent Protein Kinases*), enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, como a fosfolipase C, a fosfolipase D1 e a PIP5 (*Phosphatidyl-4, 5-phosphate 5-kinase*), canais de influxo de cálcio, SOS quinases (XIONG et al., 2002; ZHANG, 2004); esses genes foram encontrados entre as bibliotecas, fato que pode ter contribuído para a ativação do grande número de transcritos representantes de fatores de transcrição identificados.

Entre os transcritos detectados na cultivar BR 16 estão os fatores de transcrição da família NAC, uma das maiores famílias de fatores de transcrição identificadas em plantas (OLSEN et al., 2005) da qual já foram encontrados 114 genes no genoma de *Arabidopsis thaliana*, e 208 em *Glycine max* (SCHMUTZ et al., 2010). Apenas uma parcela de proteínas NAC foi caracterizada até o momento, porém foi demonstrado que essa família está envolvida em diversos processos do desenvolvimento vegetal incluindo manutenção do meristema apical, morfogênese dos órgãos florais, controle da época de floração em resposta a estresses, desenvolvimento embrionário, sinalização hormonal, regulação da síntese de parede celular secundária em fibras, defesa contra vírus e fungos, resposta a diferentes estresses abióticos, controle do ciclo celular e regulação da senescência foliar (MENG et al., 2007; OLSEN et al., 2005). Os elementos NAC apresentam uma configuração geral que consiste em uma região N-terminal extremamente conservada de ligação ao DNA (domínio NAC) e uma região C-terminal altamente divergente em sequência e extensão, que não contém nenhum domínio conhecido. A maioria dos genes NAC contém três *éxons* e 2 *introns*. Os primeiros dois *éxons* de todos os membros dessa família codificam o domínio NAC conservado, enquanto que o último *éxon* codifica o domínio divergente de transativação (DUVAL et al., 2002).

Entre os componentes de NAC identificados nas bibliotecas 3 tiveram homologia com NAC2 de *Glycine max*. Em *Arabidopsis* estudos demonstraram que o gene *Atnac2* está envolvido na resposta à salinidade e no desenvolvimento de raízes laterais (HE et al., 2005), além disso, este gene induz a expressão do gene estresse-responsivo *erd1* (TRAN et al. 2004).

No caso da soja, a maior família de fatores de transcrição é a família MYB nas bibliotecas estudadas foram encontrados 16 tipos de MYB (MYB56, MYB64, MYB78, MYB93, MYB102, MYB114, MYB117, MYB122, MYB134, MYB142, MYB145, MYB150, MYB167, MYB173, MYB176, MYBJ7) constatando que essa família gênica é bastante extensa em soja, o que indica que estes genes estão envolvidos em diferentes processos biológicos nessa espécie essenciais a sua sobrevivência. Estes genes em *Arabidopsis thaliana* formam uma família gênica com cerca de 300 membros, já em soja são mais de 750 membros (SCHMUTZ et al., 2010).

Essa família possui um domínio conservado denominado MYB que geralmente é composto de uma a três repetições imperfeitas de 51 ou 52 aminoácidos com três hélices, sendo que a segunda e terceira formam uma estrutura de ligação com o DNA *helix-turn-helix*. A cada repetição MYB podem estar especados três resíduos de triptofano que confere a característica de hidrofobia e está relacionado ao reconhecimento específico do DNA (CHEN et al., 2005). Liao e colaboradores (2008) comprovaram a importância de genes da família MYB demonstrando que os genes de soja GmMYB76, GmMYB92 e GmMYB177 conferiram em plantas transgênicas de *Arabidopsis* maior tolerância a seca, salinidade e frio.

Foram constatadas diferentes moléculas responsáveis pela proteção celular e ajuste osmótico. A presença de proteínas LEA foi induzida pelas condições de estresse, pois em condições normais essas proteínas não são expressas em tecidos vegetais e elas são induzidas por estresse osmótico ou aplicação exógena de ABA. Proteínas LEA compreendem a maior categoria de proteínas estresse responsivas (KOVACS et al., 2008; KALEMBA; PUCACKA, 2007).

Diversas variações no ambiente induzem o aumento da produção de ROS, como é o caso do estresse hídrico (LALOI et al., 2004). Essas moléculas são geradas quando o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução dando origem a espécies reativas como o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil

(OH<sup>-</sup>). O oxigênio singleto também é considerado uma ROS, ele surge devido à reação do oxigênio com clorofila excitada. Cada vez mais há resultados indicando que as ROS são moléculas sinalizadoras em diversos processos celulares, como interação planta-patógeno, vias de sinalização de hormônios, crescimento, senescência, morte celular programada e respostas a estresses abióticos (MITLLER et al., 2004). Essas moléculas possuem papel duplo, podendo ser tóxicas ou sinalizadoras, isso dependerá da proporção e localização subcelular da geração de ROS, assim a rígida regulação dos níveis de ROS em diferentes compartimentos celulares tem o propósito de sinalizar e proteger de danos oxidativos (FOYER; NOCTOR, 2005).

As plantas possuem habilidade de remover ROS por produzir diferentes tipos de antioxidantes que são divididos em duas categorias: enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas catalases, superóxido dismutases, ascorbato peroxidases, monodeidroascorbato redutases, desidroascorbato reductases e glutations redutases (ASHRAF, 2009) e os não enzimáticos podem estar envolvidos na manutenção do redox (regeneração de formas reduzidas dos redutores) ou no controle de sinais metabólicos liberados secundariamente (conjugases). Dentro da categoria enzimática os antioxidantes mais bem estudados em plantas são a superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT) e ascorbato peroxidase (APX); já os não enzimáticos incluem desidroascorbato redutase (DHAR) e glutational redutase (GR), glioxilases, citocromo P450s e glicosil transferases (FOYER; NOCTOR, 2009).

Nas bibliotecas do genótipo BR 16 a presença de espécies reativas de oxigênio foi comprovada pela existência de diferentes tipos de detoxificantes celulares (Tabela 4). Lee e colaboradores (2007) demonstraram a importância de enzimas detoxificantes através de plantas transgênicas com expressão simultânea de três genes codificando enzimas antioxidantes, SOD, APX e DHAR sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S no cloroplasto de plantas de tabaco, que mostraram resultados positivos quando submetidas a estresse oxidativo.

O banco de dados Gene Ontology traz informações sobre a função do transcrito em relação ao estresse, sendo que vários genes apresentaram função para diferentes tipos de estresse. Isso ocorre, pois, uma consequência dos mecanismos moleculares de resposta à seca é a ativação da expressão de genes relacionados a outros tipos de estresses abióticos, como o frio e a salinidade, entre

eles, genes que estão no topo da cascata de sinalização, como os identificados nesse trabalho: os fatores de transcrição *nac*, *siringolide*, *c2h2*, *myb*, *dreb* e *bzip*; genes que são ativados ou não por esses fatores de transcrição e que atuam diretamente na resposta a estresses abióticos, como os genes *erd* e *lea*; e genes de resposta à sinalização do estresse, como proteínas quinases, entre outros, que estão envolvidos na proteção de macromoléculas, como enzimas e lipídeos (KIMURA et al., 2003) e na proteção de componentes celulares, como proteínas e membranas (FRIEDMANN et al., 2007). Existe, portanto uma sobreposição de rotas de resposta de diferentes tipos de estresse, especialmente quando se trata de seca, temperatura, salinidade e frio (SREENIVASULU et al., 2007).

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o nível de tolerância de uma planta não pode ser atribuído apenas por observações de resposta a nível fisiológico ou morfológico, ressaltando a importância da análise de expressão gênica. As bibliotecas subtrativas obtidas demonstraram uma grande variedade de genes relacionados aos mecanismos de resposta ao estresse, afirmando a eficiência do estresse aplicado. Os dados obtidos poderão auxiliar na determinação de genes-chaves envolvidos nos mecanismos de tolerância, porém, necessita-se ainda de estudos mais aprofundados dentro das bibliotecas para selecionar e validar genes-alvo a fim de selecionar genes que podem ser utilizados em programas de engenharia genética para obtenção de plantas cada vez mais tolerantes ao déficit hídrico.

## REFERÊNCIAS

- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 74: 12: 5350-5354, 1977.
- ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27: 84-93, 2009.
- ASSAD, E. D.; MARIN, F. R.; EVANGELISTA, S. R.; PILAU, F. G.; FARIAS, J. R. B.; PINTO, H. S.; JÚNIOR, J. Z. Forecast system of soybean crop yield for Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:5:615-625, 2007.
- ASSAD, E. D.; PINTO, H.S.; ZULO, J.J; MARIN, F.; PELLEGRINO, G. Mudanças Climáticas e a Produção de Grãos no Brasil: Avaliação dos Possíveis impactos. *Plenarium*, 5: 5:96-117, 2008.
- BACHEM, C.; VAN DER HOEVEN, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUQDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, Oxford, 9: 5:745-753, 1996.
- BARDWELL, L. Mechanisms of MAPK signaling specificity. *Biochemical Society Transactions*, 34: 5: 837-841, 2006.
- BARRERO, J. M.; RODRÍGUEZ, P. L.; QUESADA, V.; PIQUERAS, P.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant, Cell and Environmental*, 28: 2000-2008, 2006.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought e Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24:1, 23-58, 2005.
- BAUTZ, E. K.; REILLY, E. Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method. *Science*, Washington, 151:21:328, 1966.
- BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. *Biotecnologia e Desenvolvimento*. 15: 4-7, 2000.
- BENEVENTI, M. A. *Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29a e a região codante do gene dreb1a de Arabidopsis thaliana, visando tolerância à seca*. 126 p. Dissertação, 2006.

BOORSTEIN, W. R.; CRAIG, E.A. Primer extension analysis of RNA. *Methods of Enzymology*, New York, 180: 347–69, 1989.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55:407:2331-2341, 2004.

BRENNER, S.; JOHNSON, M.; BRIDQHAM, J. GOLDA, G.; LLOYD, D. H.; JOHNSON, D.; LUO, S.; MCCURDY, S.; FOY, M.; EWAN, M.; ROTH, R.; GEORGE, D.; ELETR, S.; ALBRECHT, G.; VERMAAS, E.; WILLIAMS, S. R.; MOON, K.; BURCHAM, T.; PALLAS, M.; DUBRIDGE, R. B.; KIRCHNER, J.; FEARON, K.; MAO, J.; CORCORAN, K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature Biotechnology*, New York, 18: 6: 630-634, 2000.

BURR, I.W; FOSTER, L.A. *A test for equality of variances*. Mimeo series, n. 282. University of Purdue, West Lafayette, 26p. 1972.

CAMPALANS, A.; PAGES, M.; MESSEGUER, R. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology*, 21: 633-643, 2001.

CAMPOS, A. A.; CARMÉLIO, E. C. *Construir a Diversidade da Matriz Energética: O Biodiesel no Brasil*. Biocombustíveis A Energia da Controvrsia, Editora SENAC São Paulo, 2009.

CARVALHO, M. H. C.; Drought Stress and Reactive Oxygen Species. *Plant Signaling & Behavior*, 3:3, 156-165, 2008.

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

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30:239-264, 2003.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 250–257, 2002.

CHEN, B.-J.; WANG, U.; HU, Y.-L.; WU, Q.; LIN, Z.-P. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*. *Plant Science.*, 168: 493-500, 2005.

COCHRAN, W.G; COX, G. *Experimental Designs*. Second. Edition. John Wiley. 611p. New York, 1957.

CONAB. *Acompanhamento de safra brasileira: grãos 2009-2010, quinto levantamento, fevereiro 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento.* – Brasília : Conab, 2010.

CONAB. *Soja: área e produção das safras paranaense e brasileira 2007/2008 e 2008/2009.* Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/PR/Soja%20Junho%202009.pdf> acesso em junho 2009.

DALE, J. W.; VON SCHANTZ, M. *From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology.* New York: Wiley, p. 360, 2002.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 93:11:6025-6030, June 1996.

DURÃES, O. M. Agroenergia para o Biodiesel. *Revista de Política Agrícola*, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA/SPA Brasília. DF. 1: 118, 2009.

DUVAL, M.; HSIEH, T.; KIM, S.; THOMAS, T. Molecular Characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* of NAC domain superfamily. *Plant Molecular Biology*, 50: 237:248, 2002.

EMBRAPA. *Recomendações técnicas para a cultura de soja no Paraná 2008/2009.* Londrina, 201 p. (EMBRAPA-Soja.\ Documentos, 119). 2009.

EMBRAPA. *Recomendações técnicas para a cultura da soja na região Central do Brasil (1998/99).* Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 182 p. 1998.

FARIAS, J. R. B., NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. Soja, In: *Agrometeorologia dos Cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola.* Instituto Nacional de Meteorologia – INMET, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, 17:1866-1875, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. *Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation and Practical Implications.* Antioxidants & Redox Signaling, 11:2009.

FRANK, W., MUNNIK, T., KERKMANN, K., SALAMINI, F., BARTELS D. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell*, 12:111–23, 2000.

FRIEDMANN, M.; RALPH, S. G.; AESCHLIMAN, D.; ZHUANG, J.; RITLAND, K.; ELLIS, B. E.; BOHLMAN, J.; DOUGLAS, C. J. Microarray gene expression profiling of developmental transitions in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) apical shoots. *Journal of Experimental Botany*, 58:593-614, 2007.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995-1001, 1996.

GILMOUR, S. J.; SEBLOT, A. M.; SALAZAR, M. P.; EVERARD, J. D.; THOMASHOW, M. F. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*. 124: 1854–1865, 2000.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em Produtos Comerciais de Soja. *Ciência Tecnologia e Alimentos*, Campinas, 24(4): 582-586, 2004.

GORANTLA, M.; BABU, P. R.; LACHAGARI, V. B. R.; REDDY, A. M. M.; WUSIRIKA, R.; BENNETZEN, J. L.; REDDY, A. R. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 58: 253-265, 2007.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNAcliffe, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388: 151-157, 2005.

GUO, P.; BAUM, M.; GRANDO, S.; CECCARELLI, S.; BAI, G.; LI, R.; KORFF, M.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; VALKOUN, J. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany*, 60:12:3531–3544, 2009.

HANI, N.M.; HEIDARI, R. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. *World Applied Sciences Journal* 3:3: 448-453, 2008.

HAZEN, S. P.; PATHAN, M. S.; SANCHEZ, A.; BAXTER, I.; DUNA, M.; ESTES, B.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; KREPS, J. A.; NGUYEN, H. T. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional and Integrative Genomics*, 5:104–116, 2005.

HE, X. J.; MU, R. L.; CAO, W. H.; ZHANG, Z. G.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, 44:903-916, 2005.

HERNANDEZ, D.; FRANÇOIS, P.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHRENZEL, J. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short *reads* assembled on a desktop computer. *Genome Research*. 18:802-809, 2008

HEWITT, E.J. The effects of mineral deficiencies and excesses on growth and composition. In: ROBINSON, J.B.D. (Ed.). *Diagnosis of mineral disorders in plants*. London: HMSO, 54-110, 1983.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. *The water culture method for growing plants without soils*. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

IBGE – *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em 2009.

ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K.; TENA, G.; SHEEN, J.; HENRY, Y., CHAMPION, A.; KREIS, M.; ZHANG, S.; HIRT, H.; WILSON, C.; HEBERLE-BORS, E.; ELLIS, B.E.; MORRIS, P.C.; INNES, R.W.; ECKER, J.R.; SCHEEL, D., KLESSIG, D.F.; MACHIDA, Y.; MUNDY, J.; OHASHI, Y. Walker, J.C. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Sci.* 7:301-308, 2002.

ITURRIAGA, G.; SUÁREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 10:3793-3810, 2009.

JALLEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNERSELVAM, R. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Internacional Journal of Agriculture and Biology*, 11:1:100-105, 2009.

JI, W.; CAI, L. Suppression Subtractive Hybridization PCR. In: WEISSENSTEINER, T.; GRIFFIN, H. G.; GRIFFIN, A. (Ed.). *PCR Technology: Current Innovations*, 2: 287-298, 2004.

KALEMBA, E. M.; PUKACKA, S. Possible roles of LEA proteins and HSP's in seed protection: a short review. *Biological Lett*, 44: 3-16, 2007.

KALDENHOFF, R.; RIBAS-CARBO, M.; SANS, J. F.; LOVISOLO, C.; HECKWOLF, M.; UEHLEIN, N. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell and Environment*, 31:658–66, 2008.

- KALDENHOFF, R., GROTE, K., ZHU, J. J., ZIMMERMANN, U. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 14: 121–128, 1998.
- KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiology*, 45:3:346-350, 2004.
- KAWASAKI, S., BORCHET, C., DEYHOLOS, M., WANG, H., BRAZILLE, S., KAWAI, K., GALBRAITH, D., and BOHNERT, H. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889–905, 2001.
- KIM, J.-Y.; PARK, S. J.; JANG, B.; JUNG, C.-H.; AHN, S. J.; GOH, C.-H.; CHO, K.; HAN, O.; KANG, H. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal*, 50: 439-451, 2007.
- KIM, Y.-J.; KWAK, C. -I.; GU, Y.-Y.; HWANG, I.-T.; CHUN, J.-Y. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques, Natick*, 36: 3: 424-434, 2004.
- KIMURA, M.; YAMAMOTO, Y. Y.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATO, M.; ABE, T.; YOSHIDA, S.; MANABE, K.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. Identification of *Arabidopsis* gene regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochemistry and Photobiology*, 77:226-233, 2003.
- KOVACS, D.; AGOSTON, B.; TOMPA, P. Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signaling & Behavior* 3:9, 710-713, 2008.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima, 2000.
- LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signaling: the latest news, *Current Opinion in Plant Biology*, 7:323-328, 2004.
- LEE, Y. P.; KIM, S. H.; BANG, J. W.; LEE, H. S. KWAK, S. S.; KWON, S. Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26:591–598, 2007.
- LEWIN, B. *Genes VII*. Editora Artmed. Porto Alegre, 2001.
- LI, R.; LI, Y.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. **SOAP**: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24:5:713-714, 2008.

LIANG, P., PARDEE, A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257:967-971. 1992.

LIAO, Y.; ZOU, H. F.; WANG, H-W.; ZHANG, W-K.; MA, B.; ZHANG J-S.; CHEN, A-Y. Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Cell Research*, 18:1047-1060, 2008.

MATSUMURA, H.; REICH, S.; ITO, A.; SAITOH, H.; KAMOUN, S.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H.; TERAUCHI, R. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proceeding Nature Academic Science*, 100:15718-15723, 2003.

MATSUMURA, H.; ITO, A.; SAITOH, H.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H.; TERAUCHI, R. SuperSAGE. *Cell Microbiology*, 7:11–18, 2005.

MELTON, D.A.; KRIEG, P. A.; REBAGLIATI, M. R.; MANIATIS, T.; ZINN, K.; GREEN, M. R. Efficient In Vitro Synthesis of Biologically Active RNA and RNA Hybridization Probes From Plasmids Containing a Bacteriophage SP6 Promoter. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 12: 18: 7035-7056, 1984.

MENG, Q.; ZHANG, C.; GAI, J.; YU, D. Molecular Cloning sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.)Merr.). *Journal of Plant Physiology* 164: 1002—1012, 2007.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 2009.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plants Science*, 9:490-498, 2004.

MORI, I. C.; MURATA, Y.; YANG, Y.; MUNEMASA, S.; WANG, Y-F.; ANDREOLI, S.; TIRIAC, H.; ALONSO, J. M.; HARPER, J. F.; ECKER, J. R.; KWAK, J. M.; SCHOROEDER, J. I. CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca<sup>2+</sup> - Permeable Channels and Stomatal Closure. *PLoS Biology*, 4: 1749-1762, 2006.

MUNDSTOCK, C.M.; THOMAS, A.L.; Soja: *Fatores que afetam o crescimento e rendimento dos grãos*. Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Evangraf, Porto Alegre, 31p, 2005.

MUNNIK, T., MEIJER, H. J.G. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signaling pathways in plants. *FEBS Lett.*, 498:172–78, 2001.

NAGARAJ, S. H.; GASSER, R. B.; RANGANATHAN, S. A hitchhiker's guide to express sequence tag (EST) analysis. *Briefings in bioinformatics*, 8:1:6-21, 2006.

NEPOMUCENO, A. L.; NORMAN, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância a seca em plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 23:12 -18, 2001.

NEPOMUCENO A.L., STEWART J.M., OOSTEHUIS D.M., TURLEY R., NEUMAIER N., FARIAS J. R. B. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(7):1407-1416, 2000.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; CATTELAN, A. J.; OYA, T.; DELATTRE, N.; RODRIGUES, O. Bases agronômicas e fisiológicas das respostas da soja à disponibilidade hídrica. In: *Embrapa Soja. Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 2000: Ecofisiologia e Biologia Molecular*. Londrina, PR: Embrapa Soja, 164: 8-12, 2001.

NING, J.; LI, X.; HICKS, L. M.; XIONG, L. A Raf-Like MAPKKK Gene DSM1 Mediates Drought Resistance through Reactive Oxygen Species Scavenging in *Rice*. *Plant Physiology*, 152: 876-890, 2009.

NOGUEIRA, R.J.M.C., MORAES, J.A.P.V, BURITY, H.A., BEZERRA, E. N. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 13, 75-87. 2001.

OH, S. J., KIM, Y. S., KWON, C. W., PARK, H. K., JEONG, J. S., KIM, J. K. Overexpression of the Transcription Factor AP37 in Rice Improves Grain Yield under Drought Conditions. *Plant Physiology*, 150:1368-1379, 2009.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LO LEGGIO, L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Science*, 10:79-87, 2005.

OYA, T. et al. The drought tolerance characteristics of the brazilian soybean cultivars. *Plant Production Science*, Tokyo, 7:2:129-137, 2004.

PARENTE, R.C.P. *Aspectos da análise de resíduos*. Dissertação (Mestrado), ESALQ/USP, Piracicaba, 118f, 1984.

PASSOS, G. A. S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Transcriptoma - Análise da Expressão Gênica em Larga Escala Usando DNA (Arrays), *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/projeto.pdf>, 2000, acesso em janeiro de 2009.

PHILIPS, J. R., OLIVER, M. J., BARTELS, D. Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. In CAB International Desiccation and Survival in *Plants: Drying without dying*, M. Black and H. Pritchard. p.319–341, 2002.

PITOL, C.; BROCH, D. L. Soja mais produtiva e tolerante a seca, Tecnologia e Produção Soja e Milho 2008/2009, *Fundação MS para pesquisa e difusão de tecnologias agropecuárias*. Disponível em: <[www.fundacaoms.org.br/request.php?94](http://www.fundacaoms.org.br/request.php?94)> acesso em janeiro de 2009.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N.; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F.; NHANI, A. J.; WUST, C. I.; FILHO, F. C.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. Bioinformática: Manual do Usuário. *Bioteχνologia Ciência & Desenvolvimento*, 29: 12-25, 2001.

REISER, V.; RAITT, D. C.; SAITO, H. Yeast osmosensor *SLN1* and plant cytokinin receptor *Cre1* respond to changes in turgor pressure. *Journal Cell Biology*, 161: 1035-1040, 2003.

RENSINK, W. A.; BUELL, C. R. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science* 10, 603–609. levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiology*, 98: 626–631, 2005.

RIPLEY, B.; FROLE, K.; GILBERT, M. Differences in drought sensitivities and photosynthetic limitations between co-occurring C3 and C4 (NADP-ME) Panicoid grasses. *Annals of Botany* 105:493–503, 2010.

RUDD, S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences. *Trends in Plant Science*, 8:7:321-329, 2003.

SAGE, R. F.; KUBIEN, D. S. The Temperature Response of C3 and C4 Photosynthesis. *Plant Cell and Environment*, Oxford, 30:9:1086-1106, 2007.

SANT'ANA, J. L. N.; ALMEIDA, I. R. A Variabilidade das Chuvas e a Expansão da Cultura da Soja no Brasil: Cenários Possíveis sob a Hipótese das Mudanças Climáticas. Disponível em: <http://www4.fct.unesp.br/docentes/geo/joaolima/a%20variabilidade%20das%20chuvas%20e%20a%20expans%20da%20cultura%20da%20soja%20no%20Brasil.pdf>, acesso em outubro de 2009.

SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos). SAS, software: user's guide: version 8.2. 6 ED Cary, 201p, 2001.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J. Genome Sequence of the Palaeopolyploid Soybean. *Nature*, 463: 178-183, 2010. 74

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science*, Washington, 270: 20: 467-470, 1995.

SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory Metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 296-300, 2007.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31: 279-292, 2002.

SETUBAL, J. C. Bioinformática In: Mir. L. (Org). *Genômica*. São Paulo. Atheneu, 105-117, 2004.

SHAPIRO, S.S; WILK, M.B. "An analysis of variance test for normality". *Biometrika* 52:591-611. 1965.

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*, 3:217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 410-417, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 221-227, 2007.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; ONATE-SANCHEZ, L. Transcription factor in plant defense and stress response. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:430-436, 2002.

SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytology*, 151:35-66, 2001.

SREENIVASULU, N.; SOPORY, S. K.; KISHOR, D. P. B. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*, 338: 1-13, 2007.

STOCKSTAD, E. State sue over global warming. *Science*, v.305, p. 590, 2004.

STRECK, N. A. Stomatal Response to Water Vapor Pressure Deficit: an Unsolved Issue. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9:4:317-322, 2003.

SUN, W.; BERNARD, C.; VAN DE OTTE; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. At-HSP17. 6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27: 407–415, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KAZUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthases in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 29: 417-426, 2002.

TAMURA, T.; HRA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology*, 131: 454-462, 2003.

TENA, G.; ASAI, T.; CHIU, W. L.; SGEEN, J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Cell Biology*. 4: 392-400, 2001.

TRAN, L. S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; SIMPSON, S. D.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; FUJITA, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16:2481–2498, 2004.

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. *Biometrics* 5:232-242. 1949.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* 25, 173–194, 2002.

UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion of Biotechnology*, 17:113–122, 2006.

UNO, Y., FURIHATA, T., ABE, H., YOSHIDA, R., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *PNAS*, 97:11632-11637, 2000.

USDA United States *Departamento de Agricultura*, World Agricultural Supply and Demand Estimates. World Agricultural Outlook Board, WASDE – 479, 2010.

- VAN DE MORTEL, M, RECKNOR, J. C.; GRAHAM, M. A.; NETTLETON, D, DITTMAN, J. D., NELSON, R. T.; GODOY, C. V.; ABDELNOOR, R. V.; ALMEIDA, A. M. R.; BAUM, T. J.; WHITHAM, A. S. Distinct Biphasic mRNA Changes in *Response to Asian Soybean Rust Infection*. *MPMI* 20(8):887–899, 2007.
- VANDERAUWERA, S.; DE BLOCK, M.; DE STEENNE, N. V.; VAN DE COTTE, B.; METZLAFF, M.; BREUSEGEM, F. V. Silencing of poly (ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0706668104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0706668104)>. 104:15150-15155, 2007.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270: 20: 484-487, 1995.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J-K. Cell Signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, p. 165-183, 2002.
- WEBER, A. P. M.; WEBER, K. L.; CARR, K.; WILKERSON, C.; OHLROGGE, J. B. Sampling the arabidopsis transcriptome with massively parallel pyrosequencing. *Plant Physiology*, Washington, 144: 1:32-42, 2007.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fringerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 20: 19: 4965-4970, 1992.
- WINTER, E.; YAMAMOTO, F.; ALMOGNESA, C.; PERUCHO, M. A Method to Detect and Characterize Point Mutations in Transcribed Genes: Amplification and Overexpression of the Mutant c-Ki-ras Allele in Human Tumor Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 82: 22: 7575-7579, 1985.
- WISNIEWSKI, M.; BASSETT, C.; NORELLI, J.; MACARISINA, D.; ARTLIPA, T.; GASICB, K.; KORBAND, S. Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'RoyalGala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 133:298–317,2008.
- WU, X., SHIROTO, Y., KISHITANI, S. ITO, Y., TONYAMA, K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep*, 28: 21-30, 2008.
- YAMADA, M.; MORISHITA, H.; URANO, K.; SHIOZAKI, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIBA, Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56:417:1975–1981, 2005.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold estresses. *Plant Biology*, 57: 781-803, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KOIZUMI, M.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology*, 25: 217-224, 1992.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Calcium / Calmodulin mediated signal network in plants. *Trends Plants Science*. 8: 505-512, 2003.

ZANCOPE, G. J.; NASSER, J. M. *O Brasil que deu Certo: a saga da soja brasileira*. Editora Triade, 2005.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. From Laboratory to Field. Using Information from *Arabidopsis* to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops. *Plant Physiology*, 135: 615-621, 2004.

ZHU, J. K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: 941-948, 2000.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Review in Plant Biology*, 53:247-73, 2002.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A. A., SILVEIRA JÚNIOR, P. *Sistema de Análise Estatística- SANEST*, Registro na SEI No. 066060, UFPEL, Pelotas, 63pp, 1982.