

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM SOJA
ATRAVÉS DE MICROARRANJOS DE DNA E PCR EM
TEMPO REAL**

Renata Stolf
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM SOJA
ATRAVÉS DE MICROARRANJOS DE DNA E PCR EM
TEMPO REAL**

Renata Stolf

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Co-orientador: Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RENATA STOLF - nascida em Piracicaba/SP, em 1º de novembro de 1979, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, em fevereiro de 2003. Foi mestre em Genética e Biologia Molecular pela mesma Universidade, em fevereiro de 2005. Ingressou no Programa de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, em março de 2005. Durante o doutoramento, foi professora assistente de Fisiologia Vegetal na Universidade Estadual de Londrina, no ano de 2005 e participou do “JIRCAS Visiting Research Fellowship Program” – oferecido pelo “Japan International Research for Center Agricultural Science” (JIRCAS) – Japão, no ano de 2006. Ainda no período do doutoramento participou ativamente do projeto de “Introdução de genes por biobalística e prospecção gênica visando tolerância à seca”, coordenado pela Embrapa Soja.

**“A persistência é o caminho do êxito”
(Charles Chaplin)**

À minha avó Jacinta de Carvalho Dias (in memorian),

**“Na simplicidade do conhecimento foi exemplo de
determinação, amor e bondade”.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP e à Embrapa Soja pela oportunidade em realizar esse trabalho;

À Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos pela orientação nesse trabalho, pela **credibilidade** e pelos exemplos de dedicação e profissionalismo;

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, pela orientação nesse trabalho, pela agradável convivência durante os cinco anos que estive no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, pelos exemplos de **honestidade** e competência os quais aprecio com respeito e admiração, e por sempre me incentivar e ensinar a seguir em frente, mesmo que os obstáculos apareçam;

Ao Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor pelo apoio dado durante todo o desenvolvimento do trabalho, pelas correções e críticas;

À Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, exemplo de dedicação, profissionalismo e, acima de tudo, pela demonstração de amizade e companheirismo, sempre disposta a ajudar. Obrigada pelo suporte nas análises estatísticas;

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino pelas valiosas correções, críticas, ajuda, confiança e amizade;

Ao JIRCAS pelo apoio financeiro concedido para grande parte da realização desse trabalho e pela oportunidade em participar do Programa “Visting Research Fellowship” e ao Dr. Naoki Yamanaka, pelas críticas, apoio e ensinamentos durante a execução desse trabalho;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante parte da realização desse trabalho;

Ao Dr. Eliseu Binneck e aos Ms. Rodrigo Matheus Pereira, Luciano Kishi e Maurício Cantão pela contribuição na análise dos dados por bioinformática;

À Dra. Lúcia Carareto-Alves e ao Dr. Jackson Marcondes pela disposição em ajudar na parte de confecção e análise dos microarranjos de DNA e pelas sugestões dadas ao trabalho;

Aos queridos amigos da equipe de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, fundamentais na realização desse trabalho: Silvana R. Rockenback Marin, César Augusto Silveira, Vera Pierotti, Adriana Polizel, Danielle Gregório, Claudinei de Freitas, Nilson Vieira, João Vitor Maldonado, André Luís Passionato, Maria Cecília do Amaral Soldera, Gustavo Macorini Mendes, Michele Pires Rincão, Maria Theresa Bazzo Martins, André Paulo, Renata Fuganti, Antônio Augusto Lazarini Barboza;

Às amigas Amanda Alves Paiva e Selma Pereira dos Santos pela imensa ajuda, companheirismo, amizade e participação em todas as etapas do trabalho;

À amiga Lizandra Catelli, por dividir comigo todos os momentos (“inesquecíveis”) do doutorado;

Às amigas Daniela Sarti e Daniela Abreu por me acolher em Jaboticabal durante parte do tempo que estive realizando o trabalho;

Às queridas amigas Magda Beneventi e Noéle Giacomini Lemos, pelo carinho e amizade eterna, sempre me apoiando e sugerindo preciosas idéias;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Plantas da UNESP que me ajudaram muito, em especial: Érico Oliveira, Denílson, Tehuni; Eliamar;

Ao meu namorado José Ubirajara Vieira Moreira que soube ser companheiro, amigo e, com paciência e compreensão me ajudou em muitas etapas desse trabalho, acreditando sempre na minha capacidade e no meu profissionalismo;

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Vera, meu irmão Ricardo e minha cunhada Thaís, que sempre se dedicaram à família, ajudando-me em todas as situações. Meu amor e eterno agradecimento!

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Mecanismos de Percepção do Estresse e Genes Envolvidos na Tolerância à Seca	3
2.2 Análise da Expressão Gênica	8
2.2.1 Microarranjos de DNA	9
2.2.2 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	12
2.2.3 Métodos baseados em etiquetas de seqüências expressas	13
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2 – ARTIGO I	28
RESUMO.....	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1 Seleção de Eventos Geneticamente Modificados com a Construção <i>rd29a: dreb1a</i>	32
2.2 Análise Funcional	32
2.2.1 Desenho experimental: experimento de seca com os eventos P1333 e P1378	32
2.2.2 Desenho experimental: microarranjos de Oligonucleotídeos	33
2.3 Análise de Expressão por Microarranjos de Oligonucleotídeos	34
2.4 Análise de Expressão por RT-qPCR	35
2.5 Parâmetros Fisiológicos	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

3.1 Seleção de Eventos Transformados	36
3.2 Experimento de Seca com os Eventos P1333 e P1378	37
3.2.1 Análise de expressão	37
3.2.2 Análises fisiológicas	39
3.3 Experimento de Microarranjos de Oligonucleotídeos	45
3.3.1 Confirmação da expressão do gene <i>Atdreb1a</i> nos eventos transformados	45
3.3.2 Análise de expressão gênica por microarranjos	46
3.3.2 Análises fisiológicas	54
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO 3 – ARTIGO II	67
RESUMO	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAIS E MÉTODOS	69
2.1 Delineamento Experimental para as Sondas dos Microarranjos de cDNA	70
2.2 Microarranjos de cDNA: Confecção, Hibridização e Análise	70
2.2.1 Construção dos microarranjos de cDNA	70
2.2.2 Síntese de cDNAs marcados com fluoróforos	71
2.2.3 Hibridizações	72
2.2.4 Obtenção das imagens e análise dos dados	72
2.7 PCR Quantitativo em Tempo Real	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
CAPÍTULO 4 – ARTIGO III	106
RESUMO	106
1 INTRODUÇÃO	107
2 MATERIAIS E MÉTODOS	108
2.1 Experimento de Hidroponia	108
2.2 Experimento em Vasos Contendo Areia	109
2.3 Desenho de Primers	110

2.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	110
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	112
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES	121

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – ARTIGO I	28
Tabela 1. Seqüência dos “primers” usados na reação de PCR convencional e o tamanho esperado dos fragmentos gerados	32
Tabela 2. Seqüência de “primers” usados na RT-qPCR	36
Tabela 3. Segregação do transgene <i>Atdreb1a</i>	37
Tabela 4. Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P58 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos	47
Tabela 5. Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P1333 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos	50
Tabela 6. Concentração de macronutrientes e micronutrientes em eventos de soja transformados com a construção <i>rd29a: dreb1a</i> , P58 e P13333, e BR16 não transformada (controle) na condição controle (15% de UG) e durante déficit hídrico severo (2,5% de UG). Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	55
CAPÍTULO 3 – ARTIGO II	67
Tabela 1. Seqüência dos primers utilizados na RT-qPCR para os genes escolhidos a partir dos resultados de microarranjos de cDNA e o tamanho dos fragmentos gerados.....	75
Tabela 2. Parâmetros aplicados pela ferramenta SAM, durante a análise dos dados de microarranjos de cDNA, e número de genes diferencialmente expressos para as duas cultivares de soja, Conquista e BR16, em dois períodos de estresse (T_1 , 25 e 50 minutos de estresse e T_2 , 75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0 , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA	78

Tabela 3. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no primeiro período de estresse – T ₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T ₀ , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA	79
Tabela 4. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no segundo período de estresse – T ₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T ₀ , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA	82
Tabela 5. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no primeiro período de estresse – T ₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T ₀ , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA	85
Tabela 6. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no segundo período de estresse – T ₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T ₀ , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA	86
Tabela 7. Análise comparativa da expressão de genes diferencialmente expressos por microarranjos de cDNA e RT-qPCR	93
CAPÍTULO 4 – ARTIGO III	106
Tabela 1. Seqüência dos “primers” dos controles endógenos usados nas reações de RT-qPCR e tamanho esperado dos fragmentos gerados	110
Tabela 2. Valores da Quantificação Relativa (RQ) obtidos pela amplificação com o gene <i>Gmdreb1a</i> (alvo) e os genes dos controles endógenos <i>Gmβ-actina</i> , <i>Gmgapdh</i> , <i>Gmrrar18S</i> e <i>Gmlectina</i> em folhas e raízes.....	114

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – ARTIGO I	28
Figura 1. Níveis de expressão relativa de <i>Gmdreb1a</i> (A e B) e <i>Atdreb1a</i> (C e D) nos eventos P1333 e P1378 contendo a construção <i>rd29a: dreb1a</i> , submetida à seca. A cultivar BR16 foi usada para comparação. O RNA extraído em 20d e 34d após o estresse foi usado para as análises. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....	38
Figura 2. Taxa fotossintética (1), condutância estomática (2) e taxa de transpiração (3) nas plantas transgênicas com a construção <i>rd29a: dreb1a</i> ; comparada com a BR16 (não transgênica) submetida aos tratamentos de estresse. A) 15% de UG e B) 5% de UG. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)	40
Figura 3. Nível de expressão do gene <i>Atdreb1a</i> nos eventos P58 e P1333. A cultivar BR16 foi usada como controle negativo. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)	46
Figura 4. Representação dos genes diferencialmente expressos exclusivos de cada evento de soja, P58 e P1333, “up” e “down”-regulados. A cultivar BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.....	53
Figura 5. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e concentração intercelular de CO ₂ (D), nos eventos transformados com a	

construção *rd29a: dreb1a* comparada com a BR16 (não transgência) submetida aos tratamentos de estresse (15% e 2,5% de UG). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O círculo representa o tratamento que não apresentou diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey.....54

CAPÍTULO 3 – ARTIGO II67

Figura 1. Parâmetros fisiológicos analisados nas duas cultivares de soja para o monitoramento do tratamento de seca aplicado (0, 25, 50, 75 e 100 minutos) em sistema de hidroponia. (A) taxa fotossintética, (B) condutância estomática, (C) concentração intercelular de CO₂ e (D) temperatura foliar. ■ Conquista e □ BR16. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)77

Figura 2. Taxas de expressão gênica por categorias funcionais em duas cultivares de soja, Conquista e BR16, sob diferentes condições de seca em sistema de hidroponia (T₁, 25 e 50 minutos de estresse; T₂, 75 e 100 minutos de estresse). O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA90

Figura 3. A inter-relação dos genes diferencialmente expressos nas cultivares de soja analisadas, Conquista e BR16, sob diferentes condições de seca em sistema de hidroponia (T₁, 25 e 50 minutos de estresse; T₂, 75 e 100 minutos de estresse). O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA91

Figura 4. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *p450*, *nac2*, *erd1* e *c2h2* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀) foi usado como calibrador e o

gene *Gm β -actina* foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O esquema representa uma provável via metabólica que envolve os quatro genes estudados96

Figura 5. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *siringolide a e b*, *lea14* e *cpn10* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0) foi usado como calibrador e o gene *Gm β -actina* foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$)99

CAPÍTULO 4 – ARTIGO III106

Figura 1. Curvas de calibração obtidas a partir dos controles endógenos. As diferenças entre os valores de Ct para cada controle endógeno foi plotado como uma função do logaritmo das diluições de cDNA. A) *Gmmar18S*-E=78,99%, B) *Gmgapdh*-E=72,72%, C) *Gm β -actina*-E= 96,15%, D) *Gmlectina*-E=45,5%, e E) *Gmdreb1a*-E=96,64%.....113

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM SOJA ATRAVÉS DE MICROARRANJOS DE DNA E PCR EM TEMPO REAL

RESUMO - A seca é, atualmente, o principal fator responsável 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 é regulada a expressão dos genes relacionados com 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 a essa condição. O estudo da expressão gênica em plantas requer a quantificação precisa de RNAm expressos em diferentes situações. Assim, inicialmente foram usados os eventos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca, P58 e P1333, contendo a construção *rd29a: Atdreb1a*, em condições de 15% de umidade gravimétrica (UG) para hibridização em “chips” contendo 44 Kb de oligonucleotídeos, sendo possível identificar 100 genes diferencialmente expressos em cada evento, quando comparados com a planta controle. Posteriormente, foram utilizadas cultivares de soja contrastantes para a tolerância à seca, em diferentes condições de déficit hídrico no sistema de hidroponia, e construídos arranjos de cDNA a partir de biblioteca gerada, obtendo-se 145 genes diferencialmente expressos que codificam proteínas envolvidas direta e/ou indiretamente em rotas metabólicas de resposta a estresses bióticos e abióticos. Os grupos de genes identificados como diferencialmente expressos durante os tratamentos aplicados em ambos os experimentos foram classificados em categorias funcionais, entre eles genes envolvidos na produção de energia, fatores de transcrição, genes envolvidos em diferentes vias anabólicas e/ou catabólicas como aminoácidos, lipídeos, carboidratos e no metabolismo fotossintético, genes de respostas a estresses, genes que participam da síntese de proteínas, de vias de comunicação celular, do ciclo celular, do transporte celular e genes com função desconhecida. Os dados de microarranjos foram confirmados

através da quantificação relativa por RT-qPCR. Para a confirmação desses dados é necessária a normalização das amostras utilizadas. Um gene normalizador dos dados de expressão gênica em soja em experimentos de déficit hídrico foi identificado. Três genes normalizadores, entre eles *Gmrnar18S*, *Gmgapdh*, *Gm β -actina*, e uma referência endógena, a *Gmlectina*, foram comparados com relação à eficiência e capacidade de gerar resultados precisos e confiáveis por quantificação relativa (RQ) por RT-qPCR. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que na normalização do gene alvo (*Gmdreb1a*) a menor variação de RQ foi com o gene *Gm β -actina*, sendo, portanto, o normalizador mais apropriado para trabalhos com soja e em experimentos de seca. A seguir, oito genes obtidos dos resultados de microarranjos de cDNA foram escolhidos, para a validação por RT-qPCR baseando-se na função desses genes em resposta a estresses abióticos, entre eles os fatores de transcrição *Gmnac2*, *Gmc2h2*, *Gmsiringolide*, e os genes de resposta direta ao déficit hídrico, como por exemplo *Gmerd1*, *Gmlea14*, *Gmcpn10*. Os resultados obtidos por RT-qPCR confirmaram os dados de microarranjos de cDNA, indicando altos níveis de expressão nas plantas submetidas ao déficit hídrico.

PALAVRAS-CHAVE: DREB1A, déficit hídrico, expressão gênica diferencial, *Glycine max*, referência endógena, transgenia

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF GENE EXPRESSION RELATED TO DROUGHT TOLERANCE IN SOYBEAN THROUGH DNA MICROARRAY AND REAL TIME PCR

SUMMARY - The drought is currently the main responsible factor for losses Brazilian soybeans production. In water stress situation, several mechanisms are triggered by the plant to increase tolerance to drought. Knowing these mechanisms and how is regulated the expression of genes related to the drought response is essential in identifying routes involved in the metabolic processes of defense, and, therefore, the development of molecular strategies to obtain more tolerant plants to this condition. The study of gene expression in plants requires the quantification of RNAm expressed in different situations. So, initially, two methodologies of DNA microarray for analysis in large scale of differential gene expression were conducted. First, soybeans events genetically modified for tolerance to drought, P58 and P1333 containing the construction *rd29a: Atdreb1a* under conditions of 15% gravimetric humidity (GH) were used in "chips" containing 44 Kb of oligonucleotides, being able to identify 100 differential gene expression in each event, compared with the control plant. Subsequently, contrasting cultivars to drought were used, in different conditions of water stress in the hidroponic system, and cDNA arrays were constructed, getting 145 differential gene expression that encode proteins involved directly and / or indirectly on routes of metabolic response to biotic and abiotic stresses. The groups of genes identified with differential expression during the treatments applied in both experiments were classified into functional categories, including genes involved in the production of energy, of transcription factors, genes involved in different ways anabolics and / or catabolics as amino acids, lipids, carbohydrates and the photosynthetic metabolism, gene responses to stresses, genes that participate in the synthesis of proteins, cell communication, the cell cycle, cellular transport genes with unknown function. Data from microarrays were confirmed by relative quantification by RT-qPCR. For confirmation of such data is necessary standardization of the samples used. A method of standardization of the samples used for comparison of the relative expression has been proposed, using three normalization

genes, including *Gmrnar18S*, *Gmgapdh* e *Gm β -actin* and one endogenous controls, the *Gmlectin* have been validated. From these results obtained, it was found that the normalization of gene target (*Gmdreb1a*) had less variation and therefore control endogenous more appropriate to work with soybeans and experiments of drought is the gene *Gm β -actin*. Eight genes were chosen, the result obtained from microarrays of cDNA for the validation by RT-qPCR based on the function of these genes in response to abiotic stresses, including the transcription factors *Gmnac2*, *Gmc2h2*, *Gmsiringolide*, and genes from direct response to the deficit water, for example *Gmerd1*, *Gmlea14*, *Gmcprn10*. The results confirmed by RT-qPCR data from microarrays of cDNA, showing high levels of expression in plants subjected to water deficit.

KEYWORDS: DREB1A, water deficit, differential gene expression, *Glycine max*, reference endogenous, transgenia

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a cultura de soja ocupa um lugar de destaque no mercado de “commodities” do Brasil, sendo este o segundo maior produtor de soja do mundo, com uma produção de quase 56 milhões de toneladas, na safra de 2005/2006, com um aumento de 7,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2007).

A estimativa da safra agrícola de um país e o conhecimento da sua distribuição no espaço geográfico é de extrema importância para o planejamento estratégico do Estado, no que se refere à formulação de políticas públicas, à logística e à segurança alimentar, além de atuar como elemento importante na formação de preços nos mercados interno e externo (FIGUEIREDO, 2005). Entre as culturas agrícolas de destaque mundial, a soja tem sido objeto de um grande número de estudos, que buscam compreender e quantificar as relações ecofisiológicas que interferem na produção da cultura devido a desafios encontrados para sua adaptação nos diferentes ambientes (RUIZ-NOGUEIRA et al., 2001; BOARD, 2002; POPP et al., 2003).

A crescente expansão da soja para novas fronteiras agrícolas brasileiras, com diferentes condições edafo-climáticas, propiciou um aumento na demanda por tecnologias que dêem sustentabilidade na produção dessa cultura em locais onde seu rendimento é bastante afetado por fatores bióticos e abióticos (HASEGAWA et al., 2000; ASSAD et al., 2007).

Esforços têm sido feitos pelos segmentos que trabalham com biotecnologia em várias instituições no sentido de criar novas cultivares com características diferenciadas que contribuam para minimizar perdas na sua produção (BLUM, 2000), melhorando o entendimento da base genética de respostas adaptativas a situações de desafio e explorando esse conhecimento com a finalidade de melhorar, por exemplo, a tolerância à seca nessas plantas (TALAMÈ et al., 2007; TUBEROSA & SALVI, 2004). A busca

pelo conhecimento e pelo aprimoramento de novas técnicas nessa área está sendo de grande importância para o avanço tecnológico e o conhecimento dos países desenvolvidos em relação a essa leguminosa (BAJAJ et al., 2000).

Os projetos Genoma, financiados por várias instituições no Brasil e no mundo, estão tendo papel essencial não só no conhecimento da estrutura do genoma dos organismos, mas também na formação de pessoal especializado em técnicas de clonagem e seqüenciamento. Entretanto, a simples informação de todas as seqüências de bases que compõe um genoma não garante a revelação da função e dos mecanismos de controle da expressão de todos os genes presentes no organismo. Recentemente, com o aumento da disponibilidade de seqüências de dados, o perfil de expressão tem sido usado para identificar genes envolvidos na resposta adaptativa à seca e outros estresses abióticos (RABBANI et al., 2003; HAZEN et al., 2005; RENSINK & BUELL, 2005).

Uma importante aplicação desses estudos relata a identificação de genes estresses-induzidos que podem revelar funções essenciais ou importantes com um efeito na tolerância ou nas reações de defesa contra a perda de água (TALAMÈ et al., 2007). Por exemplo, genes candidatos poderiam ser correlacionados com *loci* de características quantitativas (QTLs), com uma importante função na tolerância à seca sob condições de campo (DIAB et al., 2004). Por sua vez, essa informação pode oferecer oportunidades adicionais para uma aplicação mais efetiva da seleção assistida por marcadores moleculares, engenharia genética, e/ou outras pesquisas genômicas (COMAI et al., 2004) para produção de cultivares tolerantes à seca.

Os mecanismos de defesa envolvidos no processo de tolerância à seca parecem ser muito similares em todo reino vegetal, o que indica a ocorrência de etapas comuns nas rotas de sinalização molecular (KASUGA et al., 2004; LAN et al., 2005). Portanto, estudos que vêm sendo desenvolvidos em espécies modelos, como *Arabidopsis* e tabaco, ou em outros tipos de estresses, podem auxiliar na identificação de genes com função chave nos mecanismos de defesa em várias espécies.

O advento de técnicas moleculares como Microarranjos de DNA, que possibilita a análise simultânea de milhares de genes (SEKI et al., 2002; ATIENZA et al., 2004;

TALAMÈ et al., 2007), e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), que permite a quantificação dos níveis de RNAm de genes de interesse em diferentes condições (BUSTIN, 2002), têm acelerado consideravelmente a compreensão dos mecanismos envolvidos e o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da tolerância a estresses (VOLKOV et al., 2003; KASUGA et al., 2004).

Nesse contexto, a biotecnologia e, em especial, a biologia molecular têm representado papel fundamental no futuro da agricultura mundial. A identificação de genes de importância econômica para a agricultura é uma das prioridades em países desenvolvidos. Após o processo de identificação, os genes são patenteados e qualquer organismo ou processo produzido com a utilização destes, implica em pagamento de “royalties” pelo usuário.

Dessa forma, o presente estudo buscou verificar os efeitos da seca, principal fator de perdas econômicas na produção brasileira, sobre o padrão global de genes em soja, em eventos geneticamente modificados e cultivares contrastantes quanto a resposta ao déficit hídrico. Espera-se que o emprego das técnicas de microarranjos de DNA e RT-qPCR forneçam resultados que possam contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa em plantas, bem como para a identificação de diferentes genes envolvidos desde a indução até a resposta final à seca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mecanismos de Percepção do Estresse e Genes Envolvidos na Tolerância à Seca

A percepção de estresses abióticos e a transdução de sinais são passos importantes na determinação da sobrevivência e na reprodução de plantas expostas a diferentes ambientes (CHINNUSAMY et al., 2004). A comparação da expressão gênica

em diferentes células, tecidos e tratamentos, devem fornecer informações necessárias para a análise e a compreensão de processos biológicos que controlam as respostas dos organismos às diferentes situações (LIANG & PARDEE, 1995).

Os mecanismos moleculares de resposta à seca começam com a percepção do sinal de estresse (XIONG et al., 2002). Os modelos de percepção estabelecidos para vegetais superiores sugerem algumas hipóteses para o início da sinalização em nível molecular. Alterações na conformação de membranas celulares devido à perda de turgor provocariam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificações na conformação ou na justaposição de proteínas sensoriais, embebidas nas membranas celulares, ou alterações na continuidade entre a parede celular e a membrana plasmática (NEPOMUCENO et al., 2001 e SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Devido à perda de pressão da parede, complexos enzimáticos ativados pelas alterações mencionadas, iniciariam uma cascata de eventos moleculares levando a indução da expressão de várias categorias de genes (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Os produtos dos genes envolvidos na resposta ao estresse funcionam como osmoprotetores, detoxificantes celulares, proteínas “turnover”, proteínas de sinalização de estresse e de regulação transcricional, sendo classificados em dois grupos: o primeiro grupo inclui as proteínas funcionais, ou seja, que protegem diretamente contra a dessecação, como proteínas LEA, osmoprotetores e o segundo grupo estaria envolvido nos mecanismos de sinalização e de regulação da expressão gênica (BOHNERT et al., 1995; BRAY, 2004; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999), muito bem representado por fatores de transcrição.

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 fosfolípidios, como a fosfolipase C, a fosfolipase D1 e a PIP5 (“Phosphatidyl-4, 5- phosphate 5- kinase”), canais de influxo de cálcio, SOS Kinases (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; XIONG et al., 2002; ZHANG, 2004).

Estudos moleculares recentes de regulação gênica de plantas submetidas à seca têm identificado alguns genes que respondem à desidratação. Dentre os genes identificados, verificou-se a presença de uma família de genes que codificam fatores de transcrição denominados DREB (“Dehydration Responsive Element Binding protein”) envolvido na ativação de vários outros genes que apresentam características de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular (SHINOZAKI & YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 2000). A introdução do fator de transcrição DREB1A, sob o controle de um promotor estresse-induzido, em *Arabidopsis thaliana*, tabaco e soja resultou em um aumento da tolerância à seca, salinidade e frio nessas espécies (KASUGA et al., 1999; KASUGA et al., 2004; BENEVENTI, 2006).

Outras famílias de fatores de transcrição estão envolvidas na sinalização e na ativação gênica: bZip (“basic region leucine zipper”), MYB, MYC, NAC e WRKY (TRAN et al., 2007). Muitos genes induzidos por ácido abscísico (ABA) apresentam um elemento “cis”-atuante (C/T ACGTGGC) na região promotora denominado ABRE (“ABA responsive element”) (MUNDY et al., 1990). A expressão constitutiva dos fatores de transcrição ABF3 e ABF4, que reconhecem os elementos ABRE na região promotora de determinados genes, aumentou a tolerância à seca em plantas de *Arabidopsis thaliana*, com expressão alterada de genes de resposta à ABA, como *rd29B*, *rab18*, *ABI1* e *ABI2* (KANG, et al., 2002).

Estudos evidenciam que a variação na concentração de cálcio no citoplasma pode estar relacionada aos mecanismos de transdução de sinal durante os estresses hídrico e salino em plantas superiores. Uma estreita relação entre o metabolismo de fosfoinosítídeo e o nível de cálcio no citosol tem sido estudada. Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) é gerado pela hidrólise de um fosfolípido de membrana, denominado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), pela fosfolipase C. O IP3 se difunde rapidamente para outras partes da célula causando não somente o influxo de cálcio do meio extracelular, mas também sua saída dos vacúolos intracelulares através de canais de cálcio dependentes de IP3. Mudanças no nível de cálcio citosólico podem levar a ativação de vários genes de resposta à seca (KIM, et al., 2004). O modelo de sinalização das células guarda via ABA é baseado em mudanças nas concentrações de

IP3 e Ca^{2+} , que levam a inativação de canais de K^+ e ao fechamento dos estômatos (KOPKA et al., 1998).

O ajuste osmótico permite a manutenção do turgor celular e dos processos que dependem deste turgor, tal como, expansão e crescimento celulares, abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter um gradiente de potencial de água favorável à absorção de água pelas raízes das plantas. O ajuste osmótico é uma das respostas celulares vitais ao déficit hídrico causado pela seca, salinidade e frio. Os solutos que participam do ajuste osmótico são inorgânicos, principalmente K^+ e Cl^- ou compostos orgânicos, denominados solutos compatíveis, como prolina e glicina betaína e carboidratos como sacarose, trehalose, pinitol, sorbitol e manitol. Os solutos compatíveis são de baixo peso molecular, altamente solúveis e não são tóxicos em altas concentrações celulares. Esses solutos protegem a planta contra o estresse através do ajuste osmótico mantendo o turgor celular, fazendo detoxificação de espécies de oxigênio reativo e estabilizando as estruturas quaternárias das proteínas (RUIZ- LOZANO, 2003; CHINNUSAMY et al., 2005).

Estresses abióticos geralmente causam disfunção em proteínas e enzimas. As chaperonas moleculares têm como função auxiliar no dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, no redobramento de proteínas desnaturadas e prevenir a agregação de partes protéicas, cujas superfícies hidrofóbicas estão expostas, o que prejudica o dobramento, contribuindo assim para a homeostase celular em condições de seca. Muitas chaperonas moleculares são proteínas envolvidas na resposta a estresses e muitas delas foram originalmente identificadas como HSPs (“Heat-Shock Proteins”) (LINDQUIST, 1988). As principais famílias de HSPs/chaperonas reconhecidamente conservadas são: HSP70, chaperoninas, HSP90, HSP100 e sHSP (“small” HSP). As diferentes classes de HSPs/chaperonas cooperam na proteção celular e apresentam complementaridade e algumas vezes sobreposição de funções na proteção de proteínas contra o estresse (WANG et al., 2004). O grupo de proteínas chamadas “Late Embryogenesis Abundant” (LEA), como o próprio nome sugere, são acumuladas em sementes durante a fase de maturação, quando é requerida a tolerância à dessecação (CLOSE, 1996). Diversos estudos têm demonstrado que as

proteínas LEA também se acumulam em tecidos vegetativos durante períodos de seca, o que reforça a função dessas proteínas na proteção contra a dessecação (PORCEL et al., 2005). Essas proteínas são reconhecidas por serem hidrofílicas, apresentando um alto conteúdo de glicina (WISE & TUNNACLIFFE, 2004). Durante a desidratação celular, as proteínas LEA representam uma importante função na manutenção estrutural de outras proteínas, vesículas, endomembranas, e no seqüestro de íons, como o cálcio, na retenção de água, e como chaperonas moleculares (CLOSE, 1996).

A regulação da expressão gênica nos seres vivos pode ocorrer tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional. A regulação em nível pós-transcricional pode envolver diferentes etapas do processamento e transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma como durante o “splicing” do pré-RNA, poliadenilação, inserção do “cap”, e ainda na tradução, sendo realizados diretamente via proteínas de ligação ao RNA, conhecidas como RBPs (“RNA binding proteins”). As proteínas RBPs contêm um ou mais sítios de reconhecimento de RNA, denominados RRM (“RNA recognition motifs”) na região N terminal, e vários sítios auxiliares na região C terminal, como o domínio rico em glicina (GR) (KENAN et al., 1991).

As proteínas de ligação ao RNA ricas em glicina (GR-RBPs) apresentam função pós-transcricional na regulação da expressão gênica em plantas sob diferentes condições de estresse. Em *Arabidopsis thaliana* o gene *gr-rbp*, designado *Atr1a*, teve seu nível de expressão aumentado sob condições de frio, no entanto, o nível de expressão foi reduzido em tratamento com ABA e seca. As plantas com o gene *Atr1a* super expresso apresentaram rápida germinação e crescimento comparadas as plantas não transformadas com o gene sob frio (KIM et al., 2005). A introdução de *gr-rbp7* de *A. thaliana* em mutantes de *E. coli* (*bx04*) sensíveis ao frio, causou uma maior sobrevivência em baixas temperaturas do que as células controle, exibindo a função de chaperona de RNA (KIM et al., 2007).

Mecanismos de resposta à seca podem, portanto, ser medidos em muitos níveis metabólicos. Diferenças na tolerância ao estresse entre diferentes cultivares ou em diferentes estádios de desenvolvimento podem resultar em diferenças na expressão de genes envolvidos em qualquer etapa da resposta, desde a percepção do sinal até os

mecanismos de transdução e regulação gênica (BOHNERET et al., 1995; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000; CHINNUSAMY et al., 2004). Entretanto, a expressão de um gene não garante que o produto específico promova a capacidade da planta em sobreviver ao estresse (NEPOMUCENO et al., 2001). Assim, uma melhor compreensão dos genes e produtos de sua expressão envolvidos nas respostas à seca é necessária para caracterizar os mecanismos que permitem a adaptação em condição limitante de água (BRAY, 2004).

2.2 Análise da Expressão Gênica

Devido a grande quantidade de estudos com RNA comparados com os estudos de proteínas, a primeira aplicação da genômica em muitos organismos é catalogar e então medir a atividade transcricional. Com a disponibilidade das seqüências gênicas, há o interesse em conseguir recursos e tecnologias capazes de analisar a atividade e a interação transcricional em larga escala em diferentes espécies de plantas (MEYERS et al., 2004). Desse modo, nos últimos anos várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para permitir a análise global e/ou pontual da expressão gênica das espécies.

A capacidade de medir simultaneamente a expressão de milhares de genes é um sistema analítico poderoso, e a disponibilidade de novas tecnologias para esse fim tem fornecido muitas novas estratégias de estudo da resposta gênica (MITRA et al., 2003). Na maioria das espécies de plantas, estes experimentos estão sendo conduzidos massivamente por microarranjos de DNA, embora haja um número crescente de tecnologias alternativas (MIKKILINENI et al., 2004). Algumas dessas tecnologias alternativas geram dados distintos e complementares aos dados de microarranjos (WORTMAN et al., 2003).

Todas as tecnologias para analisar o perfil transcricional permite a análise de populações de RNAm a partir de células ou tecidos selecionados, produzindo medidas de expressão gênica em larga escala, no entanto cada tecnologia fornece dados com diferentes utilizações e interpretações (MEYERS et al., 2004). De fato, nenhuma das

tecnologias existentes suporta todas as necessidades experimentais, e há, entretanto, vantagens e desvantagens para cada uma delas (CLOSE et al., 2004). Essas diferenças fazem as tecnologias serem complementares. Além do bom desenho e análises experimentais, a validação de diferenças quantitativas aparentes nos níveis de RNAm devido ao uso de diversas técnicas complementares, são importantes (MEI et al., 2003).

Tecnologias como ESTs (“Expression Sequence Target”), SAGE (“Serial Analysis for Gene Expression”) ou MPSS (“Massively Parallel Signature Sequencing”) não requerem conhecimento prévio das seqüências dos transcritos e, dessa forma, é possível a identificação de transcritos desconhecidos (NIELSEN et al., 2003; TALLA et al., 2003). Essa característica define uma arquitetura do tipo aberta para análise da expressão gênica. Em contrapartida, arquiteturas fechadas, como a maioria dos microarranjos de DNA, são baseadas na existência do conhecimento prévio dos genes, com sondas desenhadas para se ligarem a transcritos conhecidos (KUO et al., 2002). Os dados derivados a partir de tecnologias abertas são usados para anotação de seqüências genômicas, enquanto dados de tecnologias fechadas são geralmente mais baratos e podem mais facilmente serem usados para experimentos focalizados (YUEN et al., 2002).

2.2.1 Microarranjos de DNA

A técnica de microarranjos de DNA tem produzido uma revolução na análise de expressão. Essa técnica determina, simultaneamente, os níveis de expressão de milhares de genes (SCHENA et al., 1995). Os microarranjos podem ser construídos a partir de oligonucleotídeos ou clones de cDNA e, fornecem uma rápida via para monitorar a expressão de milhares de transcritos (MEYERS et al., 2004). A técnica é baseada na hibridização de seqüências gênicas específicas, com cDNAs ou oligonucleotídeos marcados pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes, sendo os mais usados “Cy3” e “Cy5”, através de uma reação de transcrição reversa (HALL et al.,

2000; SCHENA, 1996). O formato dos arranjos de DNA é vantajoso em relação a outros métodos de hibridização, como “Southern blotting” e “Northern blotting”, que utilizam membranas flexíveis. Nesse caso, há uma redução da área necessária para o complexo de hibridização da sonda com as seqüências de DNA arranjos (LOKHART et al., 1996; ZHU & WANG, 2000).

Os microarranjos primeiramente foram construídos a partir de fragmentos de cDNA roboticamente espotados e imobilizados em lâminas de microscópio (SCHENA et al., 1995). Essa construção, embora ainda amplamente usada, requer a manutenção e manipulação das lâminas, validação dos clones e reações de PCR em larga escala (CLOSE et al., 2004). Uma construção competitiva, que tem se tornado um sistema dominante, é baseada em pequenos oligonucleotídeos que servem como sondas (MEYERS et al., 2004).

Há várias razões para a dominância desses arranjos de oligonucleotídeos, uma delas é que os oligos podem ser sintetizados diretamente em placas ou diretamente na superfície sólida (síntese “in situ”), tornando mais fácil a obtenção de uma quantidade confiável de material, do que os arranjos produzidos com clones de cDNA (TAN et al., 2003). Além disso, exemplificando com uma planta bem caracterizada como *Arabidopsis*, clones de cDNA podem representar 60% dos genes identificados e arranjos baseados em oligos podem efetivamente selecionar regiões alvo começando a partir de uma única seqüência de DNA, como os quadros de leitura aberta (ORFs) encontradas na seqüência genômica (WORTMAN et al., 2003).

Porém, independente de qual das duas tecnologias de microarranjos são utilizadas, um dos mais sérios problemas é assegurar-se de que as seqüências de cDNA ou oligonucleotídeos estão corretamente atribuídas a sua fonte. Competição entre plataformas de microarranjos construídos com oligos tem reduzido os custos, melhorado o controle de qualidade e aumentado o número de genes por arranjos (MEYERS et al., 2004).

A maioria das limitações da técnica, entretanto, resulta do princípio da hibridização, que é o núcleo da tecnologia. Por exemplo, duplicações no genoma impedem o desenho de oligos que possam distinguir seqüências proximamente

relacionadas (ISHII et al., 2000). Em muitas espécies de plantas, duplicações no genoma, que resultam em hibridizações cruzadas, podem ser uma limitação para determinar a expressão de qualquer gene único. Em *Arabidopsis*, um dos genomas mais simples, 60% do genoma é duplicado e 17% dos genes estão presentes em tandem nos arranjos (BLANC et al., 2000; GRANT et al., 2000; VISION et al., 2000; SIMILLION et al., 2002). A migração dos arranjos de cDNA para oligos significa que as sondas podem ser selecionadas baseadas em regiões de dissimilaridade entre genes geralmente similares, melhorando a especificidade (TALLA et al., 2003).

No entanto, uma das maiores vantagens da utilização da técnica de microarranjos é a análise simultânea de um grande número de genes e de amostras (HALL et al., 2000; BUSTIN, 2000; OONO et al., 2003), sendo, portanto, um meio para se explorar os controles metabólico e genético da expressão gênica numa escala genômica (DERISI et al., 1997). Outras vantagens são a capacidade de analisar padrões de expressão de uma forma paralela, a interpretação imediata dos resultados de hibridização e a possibilidade de analisar a expressão de genes desconhecidos com seqüências contidas em bancos de dados (KHAN et al., 1999 e YAMADA et al., 2003).

A padronização do desenho experimental e dos métodos de análise poderia facilitar a comparação dos dados de microarranjos produzidos, por exemplo, por diferentes laboratórios (KAPRANOV et al., 2002). Um dos primeiros passos nessa direção foi o desenvolvimento de um conjunto padrão de detalhes técnicos que deve ser relatado para cada experimento de microarranjo. O protocolo de informação mínima sobre um experimento de microarranjo (MIAME) requer um relatório de detalhes suficientes para assegurar que os resultados de um experimento de microarranjo possa ser interpretado ou repetido independentemente (BRAZMA et al., 2001). Estes dados básicos devem ser suficientes para alojar os dados em bancos de dados públicos como o “GenBank” e permitir o uso de ferramentas de análise de dados padronizados (MEYERS et al., 2004).

Para a análise dos dados obtidos é importante que seja feita uma normalização. A quantidade de variação randômica e sistemática que ocorre nos experimentos, principalmente com relação às diferenças observadas na eficiência de marcação dos

fluoróforos utilizados, é importante para verificar as diferenças na expressão dos genes (BASSET et al., 1999). A diferença de duas vezes ou mais entre os sinais de fluorescência dos cDNAs marcados tem sido utilizada como medida de expressão diferencial e significativa de um gene sob duas situações experimentais diferentes (RUAN et al., 1998).

2.2.2 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A principal limitação da técnica de microarranjos de DNA, assim como as demais técnicas de análise de expressão gênica em larga escala, é a baixa sensibilidade comparativa que elas fornecem. Atualmente, a técnica de RT-qPCR é a mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene. Além disso, esse método também oferece dados rápidos e reprodutíveis (HAYWARD-LESTER et al., 1995; GINZINGER, 2002).

Os sinais de fluorescência são gerados por fluoróforos que são específicos para a fita dupla de DNA (dsDNA) ou por “primers” marcados por fluorescência em regiões específicas (KLEIN et al., 2002). O sinal é proporcional à quantidade de produto de PCR e o equipamento detecta o acúmulo do produto amplificado durante cada ciclo da reação (BUSTIN, 2002). Os dados são, então, medidos na fase exponencial da reação de PCR (HEID et al., 1996). Uma importante descoberta para a aplicação dessa técnica foi o sistema “Taq Man”, que utiliza a atividade exonuclease 5’-3’ da enzima DNA polimerase I bacteriana na construção de sondas de oligonucleotídeos marcados, que emitem um sinal de fluorescência somente quando clivada, baseado no princípio de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET) (MEYERS et al., 2004).

Mais recentemente, outros sistemas têm sido desenvolvidos, como “molecular beacons” e “scorpions”, que também se baseiam no princípio FRET, embora sem a necessidade de hidrólise pela atividade nuclease da enzima DNA polimerase (BUSTIN, 2000). Alternativas de menor custo com o uso de “dyes” intercalantes, como “SYBR Green”, são também encontrados com frequência na detecção do produto de PCR

(GIULIETTI et al., 2001) e têm permitido a comparação dos diferentes níveis de expressão de um mesmo gene em diferentes cultivares, tecidos ou estádios de desenvolvimento.

Nas reações de RT-qPCR, para análise de quantificação relativa é necessário utilizar um gene normalizador, que deve ser um gene constitutivo e não variar diante das condições experimentais, como por exemplo, *ma18S*, *β -actina*, *tubulina* e *gapdh*, que serve para normalizar os dados da reação (WALL & EDWARDS, 2002; KREUSER et al., 1999; BRUNER et al., 2004; BHATIA et al., 1994).

2.2.3 Métodos baseados em etiquetas de seqüências expressas

O seqüenciamento de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) é um método comum para análise do perfil de expressão gênica, embora a proposta primária do seqüenciamento de ESTs tenha sido gerar dados de seqüências gênicas (MEYERS et al., 2004). Dados de ESTs são gerados em larga escala, com seqüências parciais de clones de cDNA (aproximadamente 500pb), geralmente a partir de um grande número de bibliotecas, representando diversos tecidos e tratamentos (ADAMS et al., 1995). Comparações das freqüências de ESTs em diferentes bibliotecas podem resultar na expressão gênica diferencial (MATSUBARA & OKUBO, 1993; EWING et al., 1999) e grandes números de ESTs derivados de diversos tecidos produzem uma estimativa da expressão gênica. Porém a quantificação da expressão gênica via produção de ESTs é relativamente demorada e onerosa, tornando difícil saturar uma biblioteca.

O método “Serial Analysis for Gene Expression” (SAGE), ao contrário do seqüenciamento de ESTs, extrai somente 10 a 14 bases a partir de uma única posição dentro de cada espécie de RNAm (ZANG et al., 1997). Essas pequenas etiquetas SAGE são derivadas a partir da região 3' adjacente a região 5' do sítio de reconhecimento de uma enzima particular. A seqüência e a posição da etiqueta são importantes para a identificação do gene, a partir do qual a etiqueta foi derivada. Visto que cada ESTs requer uma leitura de seqüência única, etiquetas SAGE são liberadas do cDNA por enzimas de restrição, ligadas, amplificadas por PCR e seqüenciadas.

Esse resultado impõe um maior entendimento e um menor custo para o SAGE do que ESTs (GOWDA et al., 2004). Modificações que aumentam o comprimento da etiqueta incluem o método “LongSAGE” (SAHA et al., 2002) que produz 21 ou 22 bases e o método “SuperSAGE” que produz 26 bases (MATSUMURA et al., 2003).

Um recente avanço na análise da expressão de genes baseada em etiquetas é o “Massively Parallel Signature Sequencing” (MPSS), que é baseado em métodos para clonar moléculas de cDNA individuais em microgrânulos e, em paralelo, gerar pequenas etiquetas a partir desses cDNAs (BRENNER et al., 2000a). Uma mistura de cDNAs, derivada a partir de um tecido de planta, é clonada dentro dos microgrânulos, com a representação de moléculas nos grânulos idênticas àsquelas da amostra original (BRENNER et al., 2000b).

O resultado final do MPSS é uma abundância de milhares de etiquetas de 17 ou 20 bases, a maioria das quais identifica um transcrito. O método de seqüenciamento paralelo produz milhões de etiquetas MPSS em poucas semanas, entretanto a tecnologia é suficientemente complexa, ao contrário do SAGE, não sendo possível ser desenvolvida em laboratórios individuais (BRENNER et al., 2000a).

Os dados de expressão baseados em seqüências a partir de experimentos com ESTs, SAGE ou MPSS têm muitas utilidades. A disponibilidade de seqüências do genoma completo permite a comparação direta dessas etiquetas em seqüências (MEYERS et al., 2004). Uma limitação para todos esses métodos baseados em etiquetas, comparados aos microarranjos de DNA é que o custo das réplicas técnicas ou biológicas é difícil, de modo que as estimativas de variâncias são incompletas ou pobremente caracterizadas (CHRISTENSEN et al., 2003).

Uma outra alternativa é a tecnologia do pirosequenciamento, um método desenvolvido nos últimos anos baseado na detecção de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a síntese de DNA (MARGULIES et al., 2005). Esse sistema permite o seqüenciamento de 25 milhões de bases (20-30Mb) em quatro horas, 100 vezes mais rápidos do que o método convencional de seqüenciamento (WEBER et al., 2007).

O pirosequenciamento oferece muitas vantagens quando comparado a outras tecnologias alternativas de expressão gênica, como o SAGE, por exemplo. Primeiro, a

clonagem não é requerida. Conseqüentemente, seqüências que são difíceis de clonar, instáveis ou tóxicas em *E. coli*, podem ser obtidas por esse método. Além disso, pequenos transcritos que geralmente são removidos durante a seleção de tamanho da construção da biblioteca de cDNA não são perdidos e os dados podem ser obtidos mais rapidamente (WEBER et al., 2007).

Vários trabalhos envolvendo a técnica de pirosequenciamento têm sido feitos para análises de DNA genômico (POINAR et al., 2006). No entanto, o seqüenciamento de cDNA fornece um dos melhores custos efetivos para a descoberta de genes, uma vez que a maioria das seqüências obtidas codifica proteínas (OHLROGGE & BENNING, 2000). A ausência de íntrons e regiões inter-gênicas realçam o conteúdo da informação e facilita a interpretação dos dados. O seqüenciamento de poucos milhares de transcritos selecionados ao acaso tem sido o passo inicial que leva a identificação de enzimas chaves específicas em rotas metabólicas (WEBER et al., 2004)

Comparações do número de ESTs para um gene entre bibliotecas diferentes ou genes diferentes na mesma biblioteca podem ser um indicador confiável da expressão gênica relativa, fornecido pelo mapa de ESTs para a localização de um único gene (AUDIC & CLAVERIE, 1997). Similar ao SAGE, o pirosequenciamento fornece uma grande quantidade de ESTs e, conseqüentemente pode fornecer comparações estatísticas do nível de expressão gênica, baseada no número de ESTs lidos (WEBER et al., 2007).

Para identificar as funções das células vegetais individuais, é necessário executar a análise global da expressão gênica desses tecidos, metabólitos e outras moléculas funcionais (OHTSU et al, 2007). Assim, as tecnologias de larga escala, como microarranjos de DNA e análises recentes de transcriptomas e proteomas, podem ser um poderoso meio para entender a função dessas células.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Análise do perfil de expressão e identificação de genes relacionados com processos de resposta à seca em soja [*Glycine max* (L.) Merrill].

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos em dois eventos de soja geneticamente modificados com a construção *rd29a: dreb1a*, que confere tolerância à seca, na plataforma de microarranjos de oligonucleotídeos específica para soja da empresa Agilent.
- Construir microarranjos de cDNA, utilizando seqüências de genes expressos em cultivares de soja tolerante e sensível à seca, a partir de biblioteca de cDNA gerada.
- Identificar a expressão diferencial de genes em cultivares de soja tolerante e sensível à seca, através da hibridização em lâminas de microarranjos de cDNA construídas.
- Quantificar, por RT-qPCR a expressão de alguns genes envolvidos na resposta à seca, para estudos moleculares e bioquímicos posteriores, visando desenvolver cultivares com maior tolerância à seca.
- Disponibilizar os genes envolvidos nas respostas à seca, através da criação de bancos de genes *in vivo*, *in vitro* e informatizados, para permitir rápido acesso e uso em programas de melhoramento genético por transgenia ou assistido por unidades codificantes como marcadores moleculares.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D.; KERLAVAGE, A. R.; FLEISCHMANN, R. D.; FULDNER, R. A.; BULT, C. J.; LEE, N. H.; KIRKNESS, E. F.; WEINSTOCK, K. G.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.

Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based on 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, v. 377, n. 3, p. 174, 1995.

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**, v. 42, n. 5, p. 615-625, 2007.

ATIENZA, S. G.; FACCIOLI, P.; PERROTTA, G.; DALFINO, G.; ZSCHIESCHE, W.; HUMBECK, K.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. **Plant Science**, v. 167, p. 1359–1365, 2004.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J. M. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Research**, v. 7, p. 986–995, 1997.

BAJAJ, S.; TARGOLLI, J.; LIU, L-F.; HO, T-H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 493–503, 2000.

BASSET, D. E., EISEN, M. B., BOGUSKI, M. S. Gene expression informatics-it's all in your mine. **Nature Genetics Supplement**, v. 21, p. 51-55, 1999.

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

BHATIA, P.; TAYLOR, W. R.; GREENBERG, A. H.; WRIGHT, J. A. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. **Annal of Biochemistry**. v. 216, p. 223–226, 1994.

BLANC, G.; BARAKAT, A.; GUYOT, R.; COOKE, R.; DELSENY, M. Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome. **Plant Cell**, vl. 12, p. 1093–1101, 2000.

BLUM, A. Plant environmental stress in agriculture and biology. www.plantstress.com, 2000.

BOARD, J. E. A regression model to predict soybean cultivar yield performance at late planting dates. **Agronomy Journal**, v. 94, p.483-492, 2002.

- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1099-1111, 1995.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004.
- BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature Genetic**, v. 29, p. 365–371, 2001.
- BRENNER, S.; JOHNSON, M.; BRIDGHAM, J.; GOLDA, G.; LLOYD, D. H.; JOHNSON, D.; LUO, S.; MCCURDY, S.; FOY, M.; EWAN, M. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 630–634, 2000a.
- BRENNER, S.; WILLIAMS, S. R.; VERMAAS, E. H.; STORCK, T.; MOON, K.; MCCOLLUM, C.; MAO, J. I.; LUO, S.; KIRCHNER, J. J.; ELETR, S. In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 1665–1670, 2000b.
- BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 14, 2004.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.
- CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 225-236, 2004.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J-K. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.

- CHRISTENSEN, T. M.; VEJLUPKOVA, Z.; SHARMA, Y. K.; ARTHUR, K. M.; SPATAFORA, J. W.; ALBRIGHT, C. A.; MEELEY, R. B.; DUVICK, J. P.; QUATRANO, R. S.; FOWLER, J. E. Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1791–1808, 2003.
- CLOSE, T.J. Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Plant Physiology**, v. 97, p. 795-803, 1996.
- CLOSE, T. J.; WANAMAKER, S.; CALDO, R. A.; TURNER, S. M.; ASHLOCK, D. A.; DICKERSON, J. A.; WING, R. A.; MUEHLBAUER, G. J.; KLEINHOF, A.; WISE, R. P. A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. **Plant Physiology**, v. 134, p. 960–968, 2004.
- COMAI, L.; YOUNG, K.; TILL, B. J. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. **The Plant Journal**, v. 37, p. 778–786, 2004.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em julho/2007.
- DERISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v.278, p.680-686, 1997.
- DIAB, A. A.; TEULAT-MERAH, B.; THIS, D.; OZTURK, N. Z.; BENSCHER, D.; SORRELLS, M. E. Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.. 109, p. 1417–1425, 2004.
- EWING, R. M.; KAHLA, A. B.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J. M. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. **Genome Research**, v. 9, p. 950–959, 1999.
- FIGUEIREDO, D. C. Projeto GeoSafras - aperfeiçoamento do sistema de previsão de safras da CONAB. **Revista de Política Agrícola**, v. 14, p. 110-120, 2005.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, V. 30, p. 503–512, 2002.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GOWDA, M.; JANTASURIYARAT, C.; DEAN, R.; WANG, G-L. Robust-LongSAGE (RL-SAGE) for both gene discovery and transcriptome analysis. **Plant Physiology**, v 134, p. 890–897, 2004.

GRANT, D.; CREGAN, P.; SHOEMAKER, R. C. Genome organization in dicots: genome duplication in Arabidopsis and synteny between soybean and Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 4168–4173, 2000.

HALL, N. L. W.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KEIJER, J. The application of DNA microarray in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 271–280, 2000.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463–499, 2000.

HAYWARD-LESTER, A.; OEFNER, P. J.; SABATINI, S.; DORIS, P. A. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. **Genome Research**, v. 5, p. 494–499, 1995.

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**, v. 5, p. 104–116, 2005.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986–994, 1996.

ISHII, M.; HASHIMOTO, S.; TSUTSUMI, S.; WADA, Y.; MATSUSHIMA, K.; KODAMA, T.; ABURATANI, H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. **Genomics**, v. 68, p. 136–143, 2000.

KANG, J.; CHOI, H.; IM, M.; KIM, S. Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v. 14, p. 343–357, 2002.

KAPRANOV, P.; CAWLEY, S. E.; DRENKOW, J.; BEKIRANOV, S.; STRAUSBERG, R. L.; FODOR, S. P.; GINGERAS, T. R. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. **Science**, v. 296, p. 916–919, 2002.

- KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUSCHI-SHINOZAKI, K. E SINOZAKI, K. Improving Plant Drought, Salt, And Freezing Tolerance By Gene Transfer Of A Single Stress-Inducible Transcription Factor. **Nature America Inc**, p. 287-291, 1999.
- 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**, v. 45, n. 3, p.346-350, 2004.
- KENAN, D. J.; QUERY, C. C.; KEENE, J. D. RNA recognition: towards identifying determinants for specificity. **Trends Biochemistry Science**, v. 16, p. 214–220, 1991.
- KHAN, J. ET AL. DNA microarray tecnology: the antecipated impact on the study of human disease. **Biochemistry, Biophysic Acta**, v. 1423, p. 17-28, 1999.
- KIM, Y. J.; KIM, J. E.; LEE, J-H.; LEE, M. H.; JUNG, H. W.; BAHK, Y. Y.; HWANG, B. K.; HWANG, I.; KIM, W. T. The *Vr-PLC3* gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiate* L.). **FEBS Letters**, v. 556, p. 127-136, 2004.
- KIM, Y-O.; KIM, J. S.; KANG, H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thalian*. **The Plant Journal**, v. 42, n. 6, p. 890–900, 2005.
- 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**, v. 50, n. 3, 439-p. 451, 2007.
- KLEIN, C. A.; SEIDL, S.; PETAT-DUTTER, K.; OFFNER, S.; GEIGL, J. B.; SCHMIDT-KITTLER, O.; ENDLER, N.; PASSLICK, B.; HUBER, R. M.; SCHLIMOK, G.; BAEUERLE, P. A.; RIETHMULLER, G. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 387–392, 2002.
- KOPKA, J.; PICAL, C.; GRAY, J. E.; MÜLLER-RÖBER, B. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. **Plant Physiology**, V. 116, p. 239-250, 1998.

- KREUZER, K. A.; LASS, U.; LANDT, O.; NITSCHKE, A.; LASER, J.; ELLEBROK, H.; PAULI, G.; HUHN, D.; SCHMIDT, C. A. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. **Clinic Chemistry**, v. 45, p. 297–300, 1999.
- KUO, W. P.; JENSSEN, T-K.; BUTTE, A. J.; OHNO-MACHADO, L.; KOHANE, I. S. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. **Bioinformatics**, v. 18, p. 405–412, 2002.
- LAN, L.; LI, M.; LAI, Y.; XU, W.; KONG, Z.; YING, K.; HAN, B.; XUE, Y. Microarray analysis reveals similarities and variations in genetic programs controlling pollination/fertilization and stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, V. 59, p. 151–164, 2005.
- LIANG, P.; PARDEE A. B. Recent advances in *Differential Display*. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 274-280, 1995.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988.
- LOCKHART, D. J.; DONG, H.; BYRNE, M. C.; FOLLETTIE, M. T.; GALLO, M.V.; CHEE, M. S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1675–1680, 1996.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376–380, 2005.
- MATSUBARA, K.; OKUBO, K. cDNA analyses in the human genome project. **Gene**, v. 135, p. 265–274, 1993.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 15718-15723, 2003.
- MEI, R.; HUBBELL, E.; BEKIRANOV, S.; MITTMANN, M.; CHRISTIANS, F. C.; SHEN, M. M.; LU, G.; FANG, J.; LIU, W. M.; RYDER, T. Probe selection for high-density

- oligonucleotide arrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11237-11242, 2003.
- MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NELSON, T.; AGRAWAL, V. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, v. 135, p. 637-652, 2004.
- MIKKILINENI, V.; MITRA, R. D.; MERRITT, J.; DITONNO, J. R.; CHURCH, G. M.; OGUNNAIKE, B.; EDWARDS, J. S. Digital quantitative measurements of gene expression. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 86, p. 117–124, 2004.
- MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K. O.; CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Annals of Biochemistry**, v. 320, p. 55–65, 2003.
- MUNDY, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. E CHUA, N. H. Nuclear protein bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 406-410, 1990.
- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p.12-18, 2001.
- NIELSEN, H. B.; WERNERSSON, R.; KNUDSEN, S. Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3491–3496, 2003.
- OHLROGGE, J.; BENNING, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. **Current Opinion of Plant Biology**, v. 3, p. 224–228, 2000.
- OHTSU, K.; TAKAHASHI, H.; SCHNABLE, P. S.; NAKAZONO, M. Cell Type-Specific Gene Expression Profiling in Plants by Using a Combination of Laser Microdissection and High-Throughput Technologies. **Plant Cell Physiology**, v. 48, p. 3–7, 2007.
- OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUGITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K. E SATOH, S. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 34, p. 868-887, 2003.

- POINAR, H. N.; SCHWARZ, C.; QI, J.; SHAPIRO, B.; MACPHEE, R. D.; BUIGUES, B.; TIKHONOV, A.; HUSON, D. H.; TOMSHO, L. P.; AUCH, A. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. **Science**, v. 311, p. 392–394, 2006.
- PORCEL, R.; GÓMEZ, M.; KALDENHOFF, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Impairment of NtAQP1 gene expression in tabacco plants does not affect root colonization pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decrease their symbiotic efficiency under drought. **Mycorrhiza**, v. 15, p. 417-423, 2005.
- POPP, M. P.; DILLON, C. R.; KEISLING, T. C. Economic and weather influences on soybean planting strategies on heavy soils. **Agricultural Systems**, v. 76, p. 969-984, 2003.
- RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1755–1767, 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**, v. 98, p. 626–631, 2005.
- RUAN, Y., GILMORE, J., CONNER, T. Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. **The Plant Journal**, v. 15, n. 6, p. 821-833, 1998.
- RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal simbiosis and alleviations of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, v. 13, p. 309-317, 2003.
- RUÍZ-NOGUEIRA, B.; BOOTE, K. J.; SAU, F. Calibration and use of CROPGRO-soybean model for improving soybean management under rainfed conditions. **Agricultural Systems**, v. 68, p. 151-173, 2001.
- SAHA, S.; SPARKS, A. B.; RAGO, C.; AKMAEV, V.; WANG, C. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W.; VELCULESCU, V. E. Using the transcriptome to annotate the genome. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 508–512, 2002.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467–470, 1995.

SCHENA, M. Genome analysis with gene expression *microarrays*. **BioEssays**, v. 18, n. 5, p. 427-431, 1996.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Responses to Drought Stress. **In: Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. Biotechnology Intelligence**, p. 11-28, 1999.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Responses to Dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 217-223, 2000.

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

SIMILLION, C.; VANDEPOELE, K.; VAN MONTAGU, M.C.; ZABEAU, M.; VAN DE PEER, Y. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13627-13631, 2002.

TALAMÈ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 229–240, 2007.

TALLA, E.; TEKAIA, F.; BRINO, L.; DUJON, B. A novel design of whole-genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross-hybridization. **BMC Genomics**, v. 4, n. 38, p. 1471-1475, 2003.

- TAN, P. K.; DOWNEY, T. J.; SPITZNAGEL, E. L. J. R.; XU, P.; FU, D.; DIMITROV, D. S.; LEMPICKI, R. A.; RAAKA, B. M.; CAM, M. C. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 5676–5684, 2003.
- TRAN, L-S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S. D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, p. 46–63, 2007.
- TUBEROSA, R.; SALVI, S. QTLs and genes for tolerance to abiotic stress in cereals. In: Varshney R, Gupta PK, eds. **Cereal genomics**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 253–315, 2004.
- VISION, T. J.; BROWN, D. G.; TANKSLEY, S. D. The origins of genomic duplications in Arabidopsis. **Science**, v. 290: p. 2114–2117, 2000.
- VOLKOV, R. A.; PANCHUK, I. I.; SCHÖFFL, F. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. **Journal of Experimental Botany**, V. 54, n. 391, p. 2343-2349, 2003.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J-K. Cell Signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, p. 165-183, 2002.
- WALL, S. J.; EDWARDS, D. R. Quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. **Annals of Biochemistry**, v. 300, p. 269–273, 2002.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic response. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 244-252, 2004.
- WEBER, A. P. M.; OESTERHELT, C.; GROSS, W.; BRÄUTIGAM, A.; IMBODEN, L. A.; KRASSOVSKAYA, I.; LINKA, N.; TRUCHINA, J.; SCHNEIDEREIT, J.; VOLL, H. EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 17–32, 2004.

- WEBER, A. P. M.; WEBER, K. L.; CARR, K.; WILKERSON, C. E.; OHLROGGE, J. B.: Sampling the Arabidopsis Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing. **Plant Physiology**, v. 144, p. 32-42, 2007.
- WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what *do* LEA proteins do? **Trends Plant Science**, v. 9, p. 13–17, 2004.
- WORTMAN, J. R.; HAAS, B. J.; HANNICK, L. I.; SMITH, R. K. JR, MAITI, R.; RONNING, C. M.; CHAN, A. P.; YU, C.; AYELE, M.; WHITELOW, C. A. Annotation of the Arabidopsis genome. **Plant Physiology**, v. 132, p. 461–468, 2003.
- YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J. M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C. J.; SOUTHWICK, A. M.; WU, H. C.; KIM, C.; NGUYEN, M. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, v. 302, p. 842–846, 2003.
- YUEN, T.; WURMBACH, E.; PFEFFER, R. L.; EBERSOLE, B. J.; SEALFON, S. C. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 47-48, 2002.
- ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V. E.; KERN, S. E.; HRUBAN, R. H.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, v. 276, p. 1268–1272, 1997.
- 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**, v. 135, p. 1-7, 2004.
- ZHU, T.; WANG, X. Large-scale profiling of the Arabidopsis transcriptome. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1472–1476, 2000.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO I

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM FOLHAS DE EVENTOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADOS COM A CONSTRUÇÃO *rd29a: dreb1a*

RESUMO – As plantas respondem à seca através de um conjunto de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares que levam à tolerância ao estresse. O fator de transcrição DREB1A de *Arabidopsis thaliana* é responsável pela ativação de genes envolvidos na defesa celular à desidratação, em plantas submetidas à seca, salinidade e frio. O objetivo desse trabalho foi caracterizar fisiologicamente e analisar as mudanças na expressão de genes induzidos por déficit hídrico, em eventos de soja contendo a construção *rd29a: Atdreb1a*. Foram realizados experimentos em casa de vegetação com os eventos P58, P1333 e P1378 em condições de 15%, 5% e 2,5% de umidade gravimétrica. Embora o promotor *rd29a* de *A. thaliana* seja ativado em soja durante a desidratação celular, promovendo a expressão do fator de transcrição *AtDREB1A*, a expressão do transgene *Atdreb1a* não induziu a expressão do gene *Gmdreb1a*, endógeno da soja. Pela análise de microarranjos foi possível identificar 100 genes diferencialmente expressos em cada evento. Esses resultados mostram que soja e *Arabidopsis* têm mecanismos similares de indução de genes ortólogos em plantas transgênicas induzidas pelo *Atdreb1a* sob condição de estresse, comprovando também a conservação do fator de transcrição DREB1A entre plantas.

PALAVRAS-CHAVE: DREB1A, microarranjos, seca, RT-qPCR, transgênica

1 INTRODUÇÃO

A manutenção do rendimento das culturas sob circunstâncias ambientais adversas é provavelmente o principal desafio da agricultura moderna. Para conhecer esse desafio, é necessário entender as adaptações contrastantes das plantas para crescer em condições ótimas e de estresse, além das adaptações fisiológicas, bioquímicas e moleculares desenvolvidas por elas (LIZANA et al., 2006). A seca é um dos maiores fatores que afeta a produtividade das plantas em todo o mundo (TRAN et al., 2007), e práticas de manejo, como por exemplo, o plantio direto, podem contribuir para a redução das perdas de produtividade em ambientes com deficiência de água, mas um grande progresso pode também ser conseguido através do melhoramento genético (ZHANG et al., 2004).

Plantas respondem à seca por mudanças morfológicas e bioquímicas que primeiramente levam as plantas a se aclimatarem ao ambiente. Danos funcionais e a perda de partes da planta podem ocorrer de acordo com a severidade do estresse (CHAVES et al., 2003). Os eventos precoces de adaptação das plantas a estresses ambientais incluem a percepção e a subsequente transdução de sinais, levando a ativação de várias respostas fisiológicas e metabólicas (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; BRAY, 2004). Além disso, um grande número de genes é ativado em condições de estresse. Dessa forma proteínas que fazem parte de vias metabólicas que levam à tolerância ao estresse são produzidas (TRAN et al., 2007; WANG et al., 2003).

Genes induzidos durante condições de seca funcionam não somente na proteção celular e na produção de proteínas metabólicas importantes, mas também na regulação de genes de resposta à seca (KALEFETOGLU & EKMEKÇI, 2005). Essa regulação pode ser devido a fatores de transcrição, que é o mecanismo molecular central utilizado entre os organismos, que permite a interação de seqüências específicas de proteínas de ligação ao DNA com elementos “cis” localizados nas regiões promotora e adjacente ao gene correspondente (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2005). Muitos fatores de transcrição são estresse-induzidos, sugerindo que vários mecanismos regulatórios transcripcionais

são estresse-induzíveis e, podem funcionar na regulação de vias de transdução de sinais. Esses fatores de transcrição podem direcionar a expressão de outros genes cooperativa ou independentemente (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) e podem constituir uma rede de genes em soja.

Entre as várias famílias de fatores de transcrição em plantas, destaca-se o DREB1A. Este gene regula a expressão de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, como seca, salinidade e frio. O gene *rd29A*, que é estresse induzido e contém dois elementos “cis” atuantes, ABRE (elemento de resposta ao ácido abscísico; ABA) e DRE (elemento de resposta à desidratação)/CBF-CRT (“C-Repeat”), na região promotora, está envolvido na expressão de genes estresse-induzidos. A família do fator de transcrição AP2/EREBP que se liga a esses elementos DRE/CRT, e contém um domínio conservado de ligação ao DNA de nove pares de bases – TACCGACAT –, foi isolado de *Arabidopsis thaliana* e nomeado DREB1 e DREB2 (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Os cDNAs codificando proteínas de ligação ao DRE são DREB1A e DREB2A que foram identificados usando a técnica “one-híbrido” (LIU et al., 1998). Ambas as proteínas se ligam especificamente a seqüência DRE em *Arabidopsis* e ativam os genes regulados. A super-expressão de *dreb1a* sob o controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor, CaMV 35S, mostrou a expressão de genes alvos que são estresse-induzidos durante condições de seca, salinidade e frio (KASUGA et al., 1999; GILMOUR et al., 2000). Entre esses genes está o *rd29a*, cuja região promotora contém os elementos DRE/ABRE foi usado para direcionar a expressão da proteína DREB1A. O objetivo principal foi o de minimizar os efeitos negativos no crescimento da planta, observados quando foi usado o promotor constitutivo CaMV 35S. Uma melhor resposta na tolerância à seca em plantas geneticamente modificadas e o crescimento normal foram observados com a construção *rd29a: dreb1a* (KASUGA et al., 1999), uma vez que o promotor *rd29a* é induzido apenas sob condições de seca.

A expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra a desidratação celular tem uma função chave na tolerância à seca. O entendimento de como cada gene contribui na resposta final, nos níveis celular,

fisiológico e agrônômico pode auxiliar no desenvolvimento de plantas com maior tolerância à seca (SHINOZAKI et al., 2003; FOWLER & TOMASHOW, 2002). Os mecanismos de defesa envolvidos nesse processo parecem ser muito similares em todo o reino vegetal, assim como respostas a outros tipos de estresses bióticos e abióticos têm sido também identificadas, mostrando passos comuns nas vias de sinalização molecular (KASUGA et al., 2004).

Vários métodos estão sendo explorados para análise dos perfis de expressão em plantas. A tecnologia dos microarranjos de DNA é uma das técnicas utilizadas para unir as informações de seqüências genômicas e de transcriptomas (RABBANI et al., 2003). A tecnologia de microarranjos leva a determinação da abundância de transcritos em um genoma comparando os dados do controle com os dados experimentais e os RNAs de diferentes tratamentos são distinguidos por incorporação de diferentes sondas fluorescentes (DEYHOLOS & GALBRAITH, 2001). Os dados de microarranjos já têm sido utilizados na identificação de um grande número de processos em plantas, como o desenvolvimento de sementes (GIRKE et al., 2000), respostas a danos mecânicos na planta (REYMOND et al., 2000), sinalização em resposta ao ataque de patógenos (SCHENK et al., 2000), resposta devido a deficiência/excesso de nutrientes (THIMM et al., 2001) e respostas a estresses ambientais (KAWASAKI et al., 2001, SEKI et al., 2001, KREPS et al., 2002; OZTURK et al., 2002).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos do déficit hídrico em eventos de soja geneticamente modificados para tolerância à seca, identificando genes diferencialmente expressos envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca, através da utilização das técnicas de microarranjos de oligonucleotídeos, em “biochips” de 44 Kb, e RT-qPCR. A identificação desses genes entre os eventos geneticamente modificados será útil no sentido de explorar os mecanismos moleculares de tolerância à seca em soja, assim como selecionar e desenvolver eventos geneticamente modificados desejáveis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de Eventos Geneticamente Modificados com a Construção *rd29a: dreb1a*

O processo de transformação por biobalística na Embrapa Soja nos anos de 2005/2006 resultou em 17 eventos contendo a construção *rd29a: Atdreb1a* (BENEVENTI, 2006). Desses, dez eventos foram plantados em casa de vegetação (geração T₁) e a inserção da construção do gene exógeno foi verificada por análise de PCR convencional.

O DNA genômico das plantas foi extraído seguindo o protocolo de KEIM et al. (1988), com algumas modificações, e usado na reação de PCR convencional com três pares de “primers” que amplificam a construção *rd29a: dreb1a*. O nome e a sequência desses “primers” estão representados na Tabela 1. Para verificar se a segregação do gene *Atdreb1a* estava de acordo com a segregação Mendeliana foi feito o teste χ^2 ($p \leq 0.05$) para todos os eventos testados.

Tabela 1. Sequência dos “primers” usados na reação de PCR convencional e o tamanho esperado dos fragmentos gerados.

Nome dos primers	Sequência dos primers	Tamanho estimado do fragmento (pb)
rd29Ap5H-Fw	5' GGGAAGCTTGGCATAGATGCAATTCAATCAAAC 3'	1670
NbsTp-Rv	5' GTTTGAACGATCGGGGAAAT 3'	
AtRd29A:DREB-Fw	5' CCAATAGACATGGACCGACTACT 3'	590
AtRd29A:DREB-Rv	5' GTTCTCTAACCTCACAACCCACT 3'	
RTAtDREB-Fw	5' CGCTGACTCGGCTTGA 3'	108
RTAtDREB-Rv	5' GCATCACACATCTCATCTGAAAC 3'	

2.2 Análise Funcional

2.2.1 Desenho experimental: experimento de seca com os eventos P1333 e P1378

O experimento foi realizado usando dois eventos (P1333 e P1378) gerados

por transformação genética e a cultivar BR16 (não transformada) usada como controle. Os dois eventos geneticamente modificados foram comparados quanto à resposta de diferentes parâmetros fisiológicos e níveis de expressão do transgene, sob déficit hídrico, a fim de identificar o evento mais promissor a ser utilizado em análises posteriores com microarranjos de oligonucleotídeos. As plantas foram divididas em dois grupos: um grupo controle com 15% de umidade gravimétrica (UG) (perto da capacidade de campo) e um grupo estressado com 5% de UG (estresse moderado) (LEHANE & STABLE, 1965; JONES, 2007). Cada grupo foi composto de 12 plantas de cada genótipo, semeadas em vasos de 10-L com areia e solução nutritiva, em casa de vegetação (dia $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; noite $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR $40\% \pm 5\%$) em delineamento em blocos ao acaso com os tratamentos em arranjo fatorial: três cultivares (BR16, P1333 e P1378) e dois períodos de avaliação (20 e 34 dias após o estresse). Todas as plantas se desenvolveram por 45 dias em condições normais (15% de UG). O estresse hídrico foi iniciado por suspensão da irrigação até a umidade da areia atingir 5% de UG, 20 dias após o estresse, que correspondeu ao estágio de florescimento (R_2); e 34 dias após o estresse, que correspondeu ao estágio de enchimento de grãos (R_5); o grupo controle foi mantido a 15% de UG até a conclusão do experimento.

2.2.2 Desenho experimental: microarranjos de oligonucleotídeos

A partir dos resultados fisiológicos e moleculares obtidos com os eventos P1378 e P1333, foi escolhido o evento P1333, além de um outro evento, P58, caracterizado através de parâmetros fisiológicos, nível de expressão do transgene e alguns genes de resposta ao déficit hídrico, em trabalho anterior feito por POLIZEL (2007), para a utilização em análises de microarranjos de oligonucleotídeos. O experimento foi realizado usando os dois eventos gerados por transformação genética (P58 e P1333) e a cultivar BR16 (não transgênica), usada como controle. As plantas foram divididas em dois grupos: um grupo controle com 15% de umidade gravimétrica (UG) (perto da capacidade de campo) e um grupo estressado com 2,5% de UG (estresse severo) (LEHANE & STABLE, 1965; JONES, 2007). Cada

grupo foi composto de duas plantas de cada genótipo, semeadas em vasos de 10-L com areia e solução nutritiva em casa de vegetação (dia $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$; noite $22\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR $40\%\pm 5\%$) em um delineamento em blocos ao acaso com os tratamentos em arranjo fatorial: três cultivares (BR16, P1333 e P1378) e dois níveis de estresse (15% e 2,5% de umidade gravimétrica). Todas as plantas se desenvolveram por 30 dias em condições normais (15% de UG). O estresse hídrico foi iniciado pela suspensão da irrigação no estágio de desenvolvimento vegetativo (V_5); o grupo controle foi mantido a 15% de UG até a conclusão do experimento. Foram coletadas folhas do terceiro nó foliar de cada tratamento separadamente.

2.3 Análise de Expressão por Microarranjos de Oligonucleotídeos

Para a análise de microarranjos de oligonucleotídeos foram obtidas amostras de RNA total das folhas de dois eventos transformados com a construção *rd29a::Atdreb1a*, P58 e P1333, e plantas da cultivar BR16 (não transformadas) usadas como controle, usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi usado para a construção de moléculas alvo de cDNA marcados com os fluoróforos “Cy5” e “Cy3” (Tratamento 1: P58 marcado com “Cy5” e BR16 não transformada marcada com “Cy3” e, Tratamento 2: P1333 marcado com “Cy5” e BR16 não transformada marcada com “Cy3”, ambos em 15% de UG para hibridização das sondas contidas no arranjo “Agilent Soybean oligo microarray” contendo 44 Kb de oligos (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). A análise dos dados foi feita pelo programa “Bioconductor”. A reprodutibilidade das análises dos microarranjos foi avaliada por “dye swap”, ou seja, a inversão dos fluoróforos na construção das moléculas alvo para a hibridização das sondas. Somente genes com “p-values” $< 0,001$ foram estudados. O programa “Image Analysis”, versão A 6.1.1 (Agilent Technologies Inc.) foi utilizado para localizar e delinear cada “spot” no arranjo e integrar a intensidade de cada “spot”, fazendo a normalização dos dados pelo método “Lowess”.

2.4 Análise de Expressão por RT-qPCR

Para avaliar o nível de expressão dos genes nas folhas, foram obtidas amostras de RNA total usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo utilizado para a síntese de cDNA foi obtido por SCHENK et al. (2003), usando a enzima transcriptase reversa “Superscript II First Strand Synthesis Kit” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para preparar o cDNA, 1 µg de RNA total foi usado e misturado com “primers” randômicos (5 ng/µL).

O desenho dos “primers” para o RT-qPCR foi feito com o auxílio do programa “Primer Express” versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). A sequência dos “primers” foi determinada próxima à região 3’ do gene com fragmentos que variam de tamanho entre 75 a 155 pares de bases (pb) (Tabela 2). Os genes testados foram: *rd29a: Atdreb1a* (Acesso No.: NM118680.1), *Gmdreb1a* (Acesso No.: AF514908.1) e o normalizador *Gmrnar18S* (Acesso No.: X02623.1), usado para a normalização dos dados.

As análises de RT-qPCR foram conduzidas com o “kit SYBR Green Master Mix” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em um termociclador 7300 RT-qPCR (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de amplificação foi obtida para cada gene comparando várias diluições de cDNA e concentração dos “primers”. As condições das reações foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 2 min, 62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg e os dados foram coletados na última fase (extensão), utilizando-se 2 repetições em triplicata. Após a quantificação relativa, foi feita uma curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado. Temperaturas de dissociação do amplicon variando de 78°C a 85°C indicam amplificação de produto específico (alvo), abaixo dessa temperatura significa contaminação ou formação de dímeros de “primers” na reação. Os resultados foram analisados pelo programa “Sequence Detection” (Perkin Elmer, Massachusetts, CA, USA) usando como calibrador as plantas em 15% de UG. Para calcular a eficiência da reação foi usada a fórmula: $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$.

Tabela 2. Seqüência de “primers” usados na RT-qPCR.

Nome dos primers	Seqüência dos primers	Tamanho estimado do fragmento (pb)
RTAtDREB-Fw	5' CGCTGACTCGGCTTGGA 3'	108
RTAtDREB-Rv	5' GCATCACACATCTCATCCTGAAAC 3'	
RTGmDREB-Fw	5' CGACCAGGAGGGCAGTGAT 3'	75
RTGmDREB-Rv	5' GCTTTTCGGCGAATGGAAT 3'	
RTGmrRNA18S-Fw	5' AAACGGCTACCACATCCAAG 3'	155
RTGmrRNA18S-Rv	5' CCTCAATGGATCCATCGTTA 3'	

2.5 Parâmetros Fisiológicos

As variáveis respostas analisadas foram: taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração, estimadas pelo equipamento portátil de fotossíntese “Photosynthesis System” (LI-Cor, Inc., model LI-6400), usando o folíolo mediano do segundo nó foliar (do ápice em relação à base) completamente expandido sob intensidade luminosa de aproximadamente $1.000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Além disso, foram feitas análises de macro e micronutrientes das folhas das plantas utilizadas para a análise de microarranjos de oligonucleotídeos. Com os dados fisiológicos foram realizadas as análises exploratórias para verificar se as pressuposições de normalidade, aditividade do modelo, independência dos erros e homogeneidade de variâncias dos tratamentos estavam presentes no modelo. Posteriormente foram realizadas as análises pela ANOVA para todas as variáveis respostas. Os dois métodos foram analisados utilizando-se o programa SAS (“Statistical Analysis System”) versão 8.0 e as diferenças das médias dos níveis de estresse e dos genótipos comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos Eventos Transformados

Em trabalho anterior, mais de 1500 plântulas foram regeneradas a partir de

embriões bombardeados gerados pelo método de biobalística com a construção *rd29a: dreb1a* (BENEVENTI, 2006). Destas, um total de 941 foram testadas por reação de PCR convencional usando os três pares de “primers”. Finalmente, 17 eventos positivos foram selecionados em casa de vegetação. Entre esses eventos, dez eventos (T_1) sobreviveram e foram confirmados com a construção inserida. A segregação de sete eventos estava de acordo com a razão de 3:1, sugerindo que esses eventos possuem um único locus de inserção para o transgene *Atdreb1a*. O Valor de χ^2 quadrado para a segregação medeliana está representada na Tabela 3.

Tabela 3. Segregação do transgene *Atdreb1a*.

Eventos transformados	Valores de χ^2
27 C	0.000
45 A	121.12*
58 B	3.3
59 B	0.2
345 A	124.12*
382 B	0.12
890	94.231*
1142B	0.667
1333A	0.710
1378B	0.000

*Não houve segregação Mendeliana de 3:1 do transgene *Atdreb1a*

3.2 Experimento de Seca com os Eventos P1333 e P1378

3.2.1 Análise de expressão

A análise por RT-qPCR demonstrou que as plantas não transgênicas (BR16) apresentaram maior expressão do gene *Gmdreb1a* em 20 dias de estresse (Figura 1A). Aos 34 dias de estresse, as plantas dos eventos transformados e as não transgênicas mantiveram um nível basal de expressão do gene *Gmdreb1a*. O evento P1378 apresentou maior nível de expressão do gene *Gmdreb1a* quando comparado com o evento P1333 com 34 dias de estresse em plantas a 5% de UG (Figura 1B).

Além disso, os resultados indicaram que o evento P1333 apresentou maior nível de expressão do *Atdreb1a* quando comparado com o evento P1378, nos dois períodos de estresse (20 e 34 dias), mas ambos apresentaram níveis de expressão diferentes da BR16, no período de estresse (5% de UG), mostrando maior nível de expressão do *Atdreb1a* em 5% de UG nos dois períodos de estresse. Os níveis de expressão do fator de transcrição *Atdreb1a* nos eventos transformados, P1333 e P1378, sob condições de estresse foram maiores do que nas plantas controle (sem estresse) transformadas e nas plantas não transgênicas (Figura 1C). Na análise usando as plantas transformadas, o gene *Atdreb1a* foi diferencialmente expresso com o aumento do tempo de estresse percebido após 34 dias (Figura 1D).

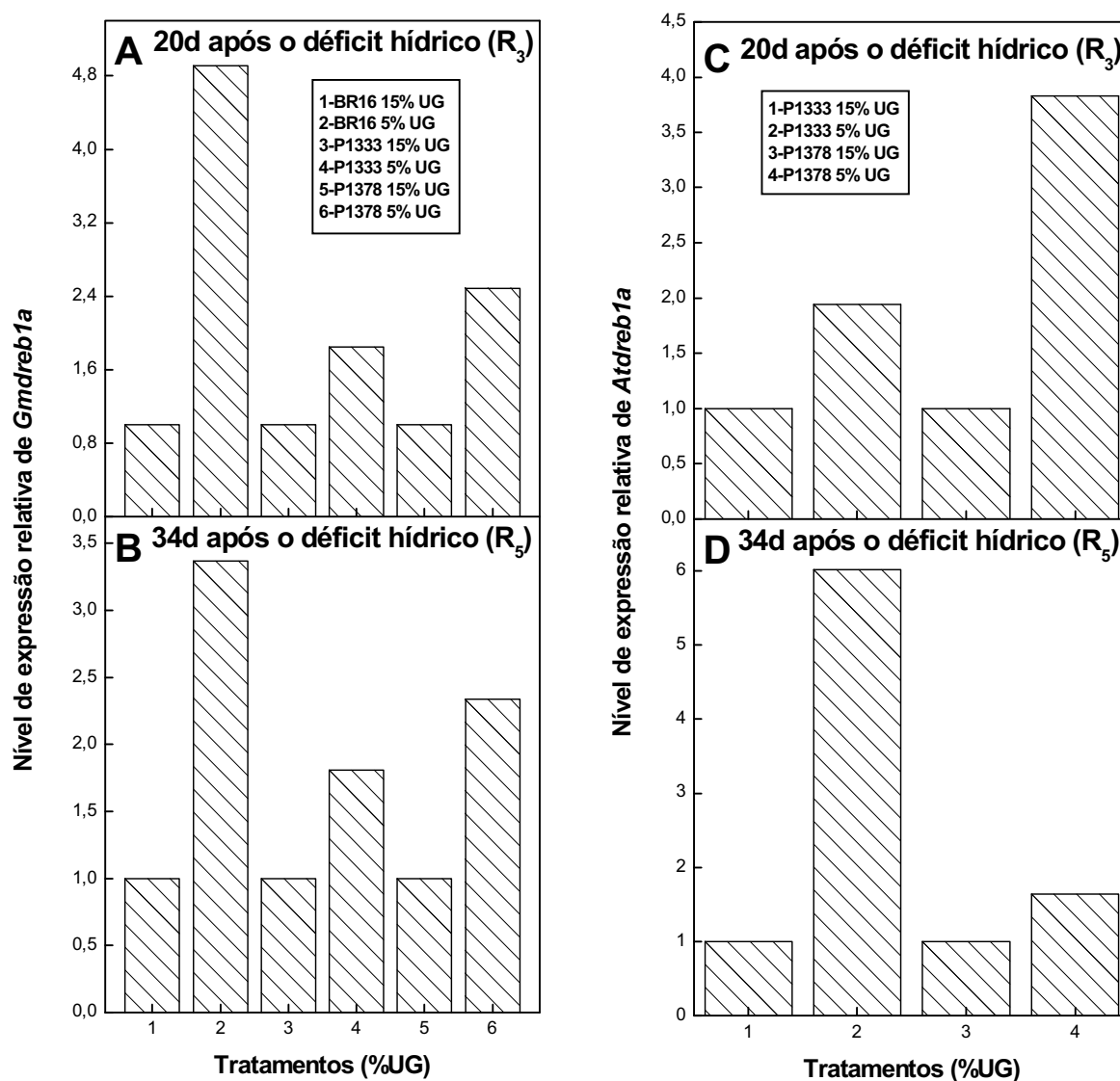


Figura 1. Níveis de expressão relativa de *Gmdreb1a* (A e B) e *Atdreb1a* (C e D) nos eventos P1333 e P1378 contendo a construção *rd29a: dreb1a*, submetida à seca. A cultivar BR16 foi usada para comparação. O RNA extraído em 20d e 34d após o estresse foi usado para as análises.

3.2.2 Análises fisiológicas

Durante as avaliações, os valores da taxa fotossintética e da condutância estomática foram observados em 15% e 5% de UG. A taxa fotossintética e a condutância estomática apresentaram diferenças nos valores das plantas transgênicas comparadas com as plantas da BR16 (não transformadas) usadas como controle, somente em 20 dias após o estresse de 5% de UG (Figuras 2.1 e 2.2). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas outras datas de avaliação.

A taxa transpiratória mostrou diferenças entre os tratamentos (15% e 5% de UG) em 13 e 48 dias após o estresse, sendo reduzido em 5% de UG. Entre os eventos transformados, foram observadas diferenças na taxa transpiratória em 48 dias com 15% de UG, sendo a menor taxa de transpiração nas plantas transgênicas em relação às plantas da BR16 (não transformadas) usadas como controle. Com 20 dias após o estresse as plantas transgênicas apresentaram maior transpiração, enquanto com 55 dias após o estresse somente as plantas do evento P1333 apresentaram maiores valores, em relação às plantas da BR16 (não transformadas) usadas como controle (Figura 2.3).

A taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração na última avaliação (55 dias após o estresse), nas plantas com 5% de UG do evento P1378 foram menores do que no evento P1333 e na BR16.

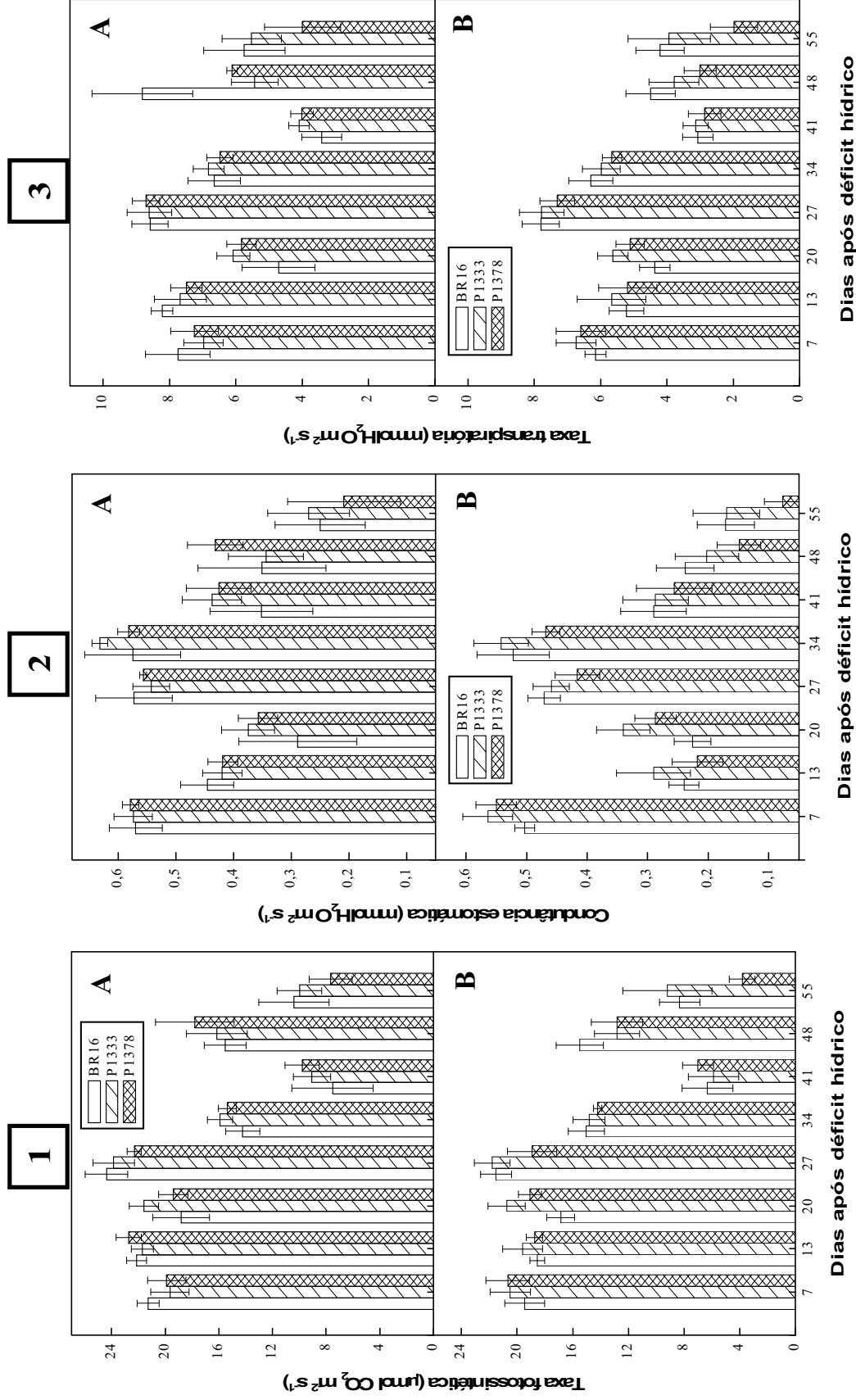


Figura 2. Taxa fotossintética (1), condutância estomática (2) e taxa de transpiração (3) nas plantas transgênicas com a construção *rd29a: dreb1a*; comparada com a BR16 (não transgênica) submetida aos tratamentos de estresse. A) 15% de UG e B) 5% de UG. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os genes do fator de transcrição DREB1A têm sido encontrados em várias plantas, como *Atdreb* (1A, 1B, 1C, 2A, 2B) de *Arabidopsis thaliana* (LIU et al., 1998; NAKASHIMA et al., 2000), *Osdreb* (1A, 1B, 1C, 1D, 2A) de *Oryza sativa* - arroz (DUBOUZET et al., 2003), *Ahdreb1* de *Atriplex hortensis* (SHEN et al., 2003), e *Tadreb1* de trigo (SHEN et al., 2003). Cada gene codifica uma proteína com o domínio AP2 conservado de 60 aminoácidos, que é responsável pela ligação da proteína DREB à região DRE (LI et al., 2005). A especificidade dos primers utilizados para a quantificação relativa foi confirmada pela construção da curva de dissociação para cada alvo.

Em 20 dias de estresse, a expressão do gene *Gmdreb1a* endógeno da soja foi mais intensa nas plantas não transformadas e submetidas ao estresse (5% de UG). Entretanto isso não favorece uma maior tolerância à seca, tendo em vista que parâmetros fisiológicos como taxa fotossintética, condutância estomática foram superiores nos eventos transformados com a construção *rd29a: dreb1a*.

Após 34 dias de estresse, os processos fisiológicos foram reduzidos. Isso ocorreu no momento em que as plantas estavam no período de enchimento de grãos (R₅), mas o maior nível de expressão do gene *Atdreb1a* permitiu que as plantas transgênicas tolerassem uma menor disponibilidade de água por mais tempo. O gene *Gmdreb1a* em outras cultivares de soja mostrou diferenças no nível de expressão em caules, folhas, flores e frutos. Nenhuma expressão foi detectada em raízes por LI et al. (2005), embora diferenças no nível de expressão tenham sido observadas em raízes nas cultivares Conquista e BR16 por STOLF et al. (in press).

O aumento dos níveis de expressão do gene *Atdreb1a* observado nesse trabalho para os eventos P1333 e P1378 (Figura 1), assim como observado no evento P58 estudado por POLIZEL (2007), em plantas submetidas ao déficit hídrico confirmou a capacidade de ativação do promotor *rd29a*. Além disso, confirmou o sucesso do processo de transformação pela inserção do transgene em uma região genômica que possibilitou sua expressão, visto que o evento P1378 apresentou uma queda nas respostas fisiológicas, após 55 dias de estresse. O maior nível de expressão do *Atdreb1a* no evento P1333, comparado ao evento P1378 pode ser a causa da redução de processos fisiológicos observados somente no evento P1378

no final do estágio de desenvolvimento (55 dias após o estresse). Isso pode ser devido, provavelmente, porque as plantas desse evento chegaram mais rapidamente no período de senescência, acelerando os ciclos de desenvolvimento. Além disso, um maior número de cópias do transgene ou quantidades de genes funcionais diferentes do outro evento pode contribuir, já que o evento P58 apresentou três cópias do transgene, identificados por “Southern blotting” e por quantificação absoluta, enquanto o evento P1333 apresentou 13 cópias do transgene (dados não mostrados). Uma outra hipótese é que a inserção do transgene pode estar perto de um “enhancer” ou acentuador, que são seqüências de DNA que aumentam a afinidade da maquinaria de transcrição por um determinado promotor (OMIRULLEH et al., 2004), no caso o *rd29a*. Plantas transgênicas derivadas da técnica de biobalística tendem a possuir a integração de múltiplas cópias do transgene no genoma (PAZ et al., 2004). Em soja já foi observado que eventos com a inserção acima de 100 cópias (REDDY et al., 2003). A interação entre múltiplas cópias pode causar silenciamento gênico e/ou tornar difícil o desenvolvimento de variedades comerciais estáveis.

KAZUGA et al. (2004) também observaram em *A. thaliana* a expressão do gene *Atdreb1a* em níveis elevados na condição controle, sugerindo que o promotor *rd29a* tem um nível de expressão basal, em condições ótimas de água no solo. A região promotora do *rd29A* apresenta dois elementos “cis” atuantes: um relacionado à mudança nas respostas do potencial osmótico e outra região de resposta ao ABA (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 1993). Essa segunda via de sinalização pode afetar a expressão do gene *Atdreb1a* independentemente da expressão do gene *Gmdreb1a*, causando um perfil de expressão distinto como foi observado nesse estudo.

A super expressão do gene *Atdreb1a* nas plantas de soja transgênicas provavelmente aumentou a tolerância à seca, sugerindo que a proteína DREB1A funciona no desenvolvimento da tolerância à seca (LIU et al., 1998). Os produtos dos genes alvos da proteína DREB1A estão conseqüentemente envolvidos no estabelecimento dessa tolerância ao estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

A função do gene *dreb1a* na expressão de genes estresse induzidos tem sido demonstrada em arroz (*Osdreb1a*) (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). A super-expressão de *Osdreb1a* em *Arabidopsis thaliana* revelou uma função similar dos genes de arroz na expressão de genes de resposta ao estresse e na tolerância ao estresse (DUBOUZET et al., 2003). Recentemente, a super-expressão do gene *Osdreb1a* ou do gene *Atdreb1a* também aumentou a tolerância à seca no arroz (ITO et al., 2006). Esses dados indicam que fatores de transcrição da família DREB são conservados e têm uma função similar na tolerância a estresses abióticos entre plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

Nos 20 dias após o estresse, as plantas transgênicas toleraram a condição de restrição de água, quando comparada à BR16, enquanto em períodos avançados essas diferenças entre transgênicas e não transgênicas foram menos evidentes, devido, provavelmente, a redução de processos fisiológicos e/ou metabólicos participando do desenvolvimento de plantas pela adição dos efeitos do estresse, e também pela variação ambiental ocorrida durante o experimento e condições de crescimento na casa de vegetação.

O tratamento de seca imposto no experimento descrito nesse estudo pode ser definido como um estresse moderado e efeitos significativos na taxa fotossintética, na condutância estomática e na taxa de transpiração foram detectadas nas plantas transgênicas comparadas com as plantas não transgênicas. Uma explicação da diferença da taxa fotossintética observada nas plantas transgênicas comparada as não transgênicas pode ser a limitação difusional (estômato e mesófilo) (BOTA et al., 2004) que parece ser mais importante nas plantas transgênicas comparada as não transgênicas, que sugere a maior eficiência do uso da água (dados não mostrados) observado nas plantas transgênicas, em consequência de um melhor funcionamento da maquinaria fotossintética nessa condição (PARRY et al., 2002; TEZARA et al., 2002; THIMMANIAK et al., 2002).

A maior condutância estomática observada nas plantas transgênicas pode ser explicada por uma maior manutenção do turgor celular (TEZARA et al., 2003). Essa maior manutenção do turgor celular pode ter sido garantida também pela

expressão de genes relacionados ao ajuste osmótico. Os níveis médios superiores de condutância estomática das plantas transgênicas tem permitido uma maior difusão de CO₂ para dentro do mesófilo das folhas, contribuindo para uma maior taxa fotossintética. De acordo com CORNIC (2000) o fechamento estomático é uma das causas da redução da fotossíntese, conseqüentemente ela reduz a disponibilidade de CO₂ no mesófilo. As diferenças entre as médias das análises fisiológicas das plantas transgênicas e da BR16 em condições de estresse foram significativas nos 20 dias após o estresse, mas somente o evento P1378 mostrou valores desses parâmetros reduzidos quando as plantas desse evento atingiram o período de maturidade, sendo evidente na última análise pelo efeito aditivo do estresse ou por uma proximidade maior da senescência foliar.

Durante a seca duas razões principais que podem causar o fechamento dos estômatos são sinais hidrofílicos (potencial de água da folha, turgor celular) e os sinais químicos (ácido abscísico; ABA). O ABA sintetizado nas raízes podem também ser transportado para a célula guarda pelo canal transpiratório, induzindo o fechamento estomático sob condições de seca pela ligação ao receptor hipotético de ABA (MULLER & WHITSHITT, 1996). A idéia recente para o controle dos estômatos na resposta à seca foi que o suplemento de água diminui, o potencial de água e o turgor celular declinam e o fechamento estomático é promovido (KALEFETOGLU & EKMEKÇI, 2005).

A maior condutância estomática observada nas plantas transgênicas sob seca quando comparada às plantas não transgênicas, sob a mesma condição de limitação de água, permitiu uma maior taxa transpiratória dessas plantas transgênicas comparadas às não transgênicas. Essa maior taxa de transpiração refletiu na redução da temperatura foliar somente nos evento P1333, 20 dias após o estresse (dados não mostrados), que foi inferior às médias observadas em plantas da BR16, com menor taxa de transpiração, e, conseqüentemente, maior temperatura foliar. Provavelmente isso também pode explicar a redução de todos os parâmetros fisiológicos no evento P1378 após 48 dias de estresse.

A seca é uma das mais comuns condições de estresse que as plantas são submetidas no ambiente e freqüentemente tem um efeito negativo na condutância

hidráulica das raízes (VANDELEUR et al., 2005). É aceito que durante a transpiração a água percorra do solo até o xilema das raízes pela via apoplástica, principalmente por um gradiente de pressão hidrostática, entretanto, quando a transpiração é restrita pelas condições de estresse como a seca, a maior parte da água segue pela via transmembrana (célula a célula) (AROCA et al., 2006).

Esses resultados são consistentes com a hipótese de que a resposta ou a adaptação das plantas à seca é um elemento chave na tolerância ao estresse (TREWAVAS, 2003). Este tipo de mecanismo pode ser mais apropriado do que mudanças estruturais constitutivas para tolerância à seca em plantas, onde o objetivo é estabilizar o rendimento em anos pobres ao manter o potencial do rendimento nos favoráveis (LAFITTE et al., 2007). Além disso, esses resultados são bons indicativos para testar essas plantas no campo e regular os processos fisiológicos.

3.3 Experimento de Microarranjos de Oligonucleotídeos

3.3.1 Confirmação da expressão do gene *Atdreb1a* nos eventos transformados

Para verificar a expressão do gene *Atdreb1a* nos eventos P58 e P1333, foi feita análise por RT-qPCR, utilizando plantas da cultivar BR16 (não transformadas) usadas como controle (Figura 3). Os resultados mostraram que a expressão foi maior no evento P1333 do que no evento P58 sob condições de estresse.

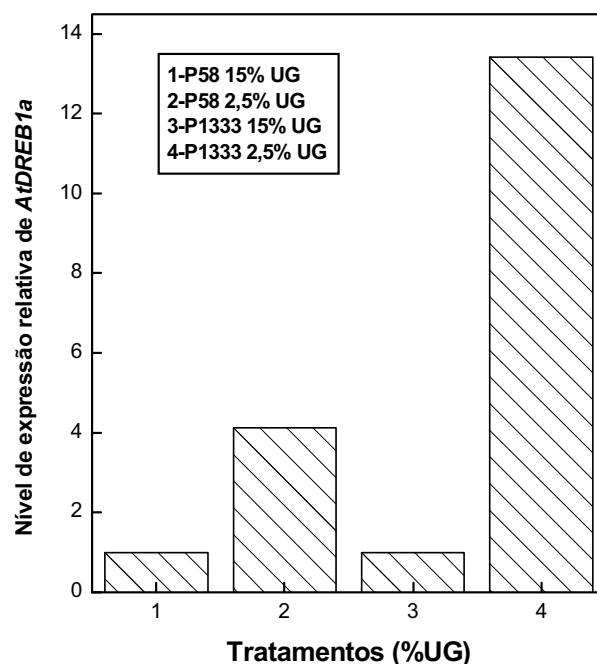


Figura 3. Nível de expressão do gene *Atdreb1a* nos eventos P58 e P1333. As plantas com 15% de UG em cada evento foram usadas como calibradores.

3.3.2 Análise de expressão gênica por microarranjos

A maioria dos genes diferencialmente expressos no evento P58 (Tabela 4) também foi identificada no evento P1333 (Tabela 5). Entre eles destacam-se fatores de transcrição como bZIP, WRKY, siringolide, domínios dedo de zinco, MYB, NAC; genes envolvidos com o metabolismo fotossintético, destacando-se genes relacionados e induzidos pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, citocromo P450 monooxigenase, aquaporina, prolina e proteínas desconhecidas, que representam 18% no evento P58 e 34% no evento P1333. Além disso, foram identificados genes “up”-regulados como os genes que codificam fatores de transcrição, aqueles envolvidos em processos metabólicos, e genes “down”-regulados, entre eles a maioria das seqüências desconhecidas, e genes envolvidos com componentes estruturais, como subunidades ribossômicas (Figura 4).

Tabela 4. Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P58 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
28598	Citocromo P450 (GMFL01-08-N24-R_367)	10
41386	Desconhecida (CO983008.1_694)	9,01
10086	Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (GMFL01-10-E03-R_618)	7,27
28282	Actin-binding FH2 domain containing protein (AW781063.1_276)	7,84
15934	Família transposase (BM178752.1_421)	-5,42
30384	Desconhecida (GMFL01-10-I02-R_324)	8,58
28661	RNAr 5S (GMFL01-12-K20-R_189)	9,3
31097	Proteína SOS2 (BU764299.1_488)	10,46
26227	Lipoxigenase-9 (LOX9) (BG156932.1_540)	7,1
16784	Lipoxigenase-9 (LOX9) (BE331586.1_538)	6,94
10758	bZIP (CD395256.1_514)	6,64
17923	Proteína associada a rubisco (CX702968.1_831)	5,85
305	Proteína transportadora de zinco (BI968082.1_502)	9,28
8187	Beta-1,3-glucanase (BU549819.1_498)	7,09
6372	Citocromo P450 monooxygenase (CA851890.1_561)	7,68
33420	Flavanone 3-hidroxilase (F3H1) (CD409540.1_254)	6,24
21173	Família WRKY17 (BE820675.1_303)	6,7
17492	Myo-inositol-1-fosfato sintase (CO983310.1_630)	6,56
2592	Nodulina associada a senescência 1A (CO984311.1_799)	9,73
9901	Família WRKY27 (CD410097.1_592)	5,97
3468	Citocromo P450 (AW780907.1_449)	8,75
12873	Proteína transportadora de zinco (BU549581.1_522)	4,64
17553	fosfoenolpiruvate carboxilase kinase (PFCK2) (AW100779.1_350)	7,56
13378	glicosiltransferase (GT4) (CX704751.1_854)	8,63
18747	Polipeptídeo rico em metionina (BF219543.1_471)	-6,04
23030	5-metiltetrahidropteroiltriglutamate--homocisteine S-metiltransferase (GMFL01-14-C22-R_450)	-6,27
27724	Polipeptídeo rico em metionina (BM523457.1_356)	6,95
251	bZIP (CO982359.1_617)	5,46
1371	Desconhecida (GMFL01-43-G19-R_395)	9,27
29357	MYB-CC (GMFL01-28-P16-R_135)	9,97
23475	bZIP36 (CO982586.1_718)	4,94
17972	Desconhecida (GMFL01-27-G05-R_467)	7,86
12460	Retroelemento (BG406161.1_224)	8,62
12232	Família WRKY27 (BI968710.1_304)	5,63
13635	Proteína relacionada a domínios dedo de zinco (GMFL01-03-B17-F_550)	5,46

Tabela 4. (Continuação) Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P58 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
24170	Nitrito redutase (BU548186.1_454)	7,91
35188	Aldo/keto reductase (GMFL01-43-F21-R_351)	10,93
32390	Desconhecida (GMFL01-21-F06-R_92)	5,88
30348	fosforibosylformylglycinamide sintase (FGAM2) (CA851071.1_622)	5,73
24834	Glucosidase II alpha (GMFL01-23-O19-R_66)	7,93
31316	Endo-1,3-beta-glucanase (CO984885.1_778)	5,04
2408	Glicosiltransferase (BM731415.1_407)	6,35
20902	bZIP120 (GMFL01-04-C09-R_282)	9,33
23462	Citochrome P450 monooxygenase (BI786934.1_514)	6,43
11290	Xiloglucana endotransglicosilase/hidrolase (GMFL01-10-N10-R_301)	7,69
9245	Lipoxygenase-2 (AI748668.1_379)	6,64
38346	MYB 122 (CO981327.1_681)	5,06
32302	Receptor de proteína kinase 3 (RLK3) (CO979228.1_701)	5,22
28259	Tirosine aminotransferase (BE473772.1_429)	7,92
37948	ATP sulfurilase (BF068249.1_438)	8,7
23149	Citochrome P450 monooxygenase (BU547208.1_531)	4,69
38183	Proteína kinase (CO980160.1_436)	10,1
11667	Pruvato kinase (BM177571.1_42)	6,95
10811	Ferrofitina (GMFL01-01-P12-R_89)	6,7
7451	Desconhecida (GMFL01-19-J08-R_559)	8,66
11506	Desconhecida (GMFL01-39-E13-R_459)	7,96
7436	Receptor de proteína kinase rico em leucina (GMFL01-29-E11-R_444)	6,88
2018	NAC2 (GMFL01-38-L17-R_326)	9,64
20056	Citochrome P450 (BE821392.1_590)	6,93
42044	Homeobox z[íper de leucina (CX547053.1_444)	-5,88
34295	Desconhecida (CD398838.1_473)	-4,6
15342	Ferro-superoxide dismutase (CO984347.1_667)	7,42
28702	Kinase dependente de ciclina CDKB (AW395193.1_335)	8,37
7244	Aquaporina (water channel protein) (GMFL01-47-N05-R_308)	7,35
19359	ReMemBR-H2 JR700 (GMFL01-16-M07-R_203)	8,75
13136	Desconhecida (GMFL01-46-J08-R_49)	8,15
12126	fosfoglicerate desidrogenase (BQ080249.1_427)	7,81
33043	Desconhecida (CF806745.1_542)	5,29
35238	Cisteína proteinase (CD391940.1_591)	7,62
2268	ATP sulfurilase (AW119723.1_130)	-5,36
12037	Transportador de aminoácido (CD399386.1_484)	-5,4

Tabela 4. (Continuação) Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P58 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
4669	Proteína induzida por auxina (AW397551.1_329)	7,08
3581	Desconhecida (GMFL01-34-P16-R_299)	9,22
32216	Desconhecida (GMFL01-15-H07-R_552)	6,52
32238	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (AW704016.1_132)	5,79
4748	Precursor da proteína kinase (BU762137.1_329)	4,4
15676	Proteína de ligação a actina (BM527081.1_383)	5,38
24073	Desconhecida (BM085723.1_494)	6,22
9600	Carbonic anidrase (GMFL01-06-M17-R_221)	11,42
23152	Desconhecida (BI969137.1_608)	6,88
21287	Glicosiltransferase (BF324339.1_154)	8,58
32823	Flavonol sintase (CF806971.1_444)	5,84
31493	Isoflavanone 4'-O-metiltransferase (BU577913.1_521)	5,13
19013	Desconhecida (GMFL01-01-K14-F_374)	7,91
3008	Desconhecida (CO980024.1_361)	9,38
36362	Transportador de histidina-lisina (BU763816.1_429)	6,7
13331	Proteína induzida por auxina (GMFL01-30-A21-F_610)	-6,42
10989	Desconhecida (GMFL01-21-E08-R_450)	7,34
1485	Desconhecida (GMFL01-43-A03-R_452)	-5,57
2267	Família WRKY30 (BU579241.1_402)	5,58
6123	Proteína de ligação a cauda poly(A) (BQ473431.1_383)	7,72
31620	Receptor da proteína kinase 3 (CO984081.1_777)	6,8
35926	Família de proteína integral de membrana HPP (GMFL01-06-L03-R_551)	9,76
25475	Desconhecida (BI969751.1_679)	7,05
9696	Terpeno sintase (CO981146.1_493)	10,04
16601	Proteína dedo de zinco - CCCH (BE822876.1_588)	-8,15

* Similaridade pelo blastx (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Nível de expressão dos genes identificados como diferencialmente expressos. Sinais positivos="up"-regulados, sinais negativos="down"-regulados.

Tabela 5. Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P1333 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
30345	Desconhecida (GMFL01-43-H16-R_100)	10,58
5888	Desconhecido (GMFL01-15-F24-R_255)	9,6
40234	Desconhecida (GMFL01-15-J13-R_221)	8,35
2156	beta-amylase (GMFL01-14-F20-R_547)	8,3
31189	Desconhecido (GMFL01-46-L17-R_270)	7,47
28282	Desconhecido (AW781063.1_276)	7,12
29373	Desconhecido (GMFL01-46-E18-R_325)	8,66
32302	receptor-like protein kinase 2 - RLK2 (CO979228.1_701)	5,67
11133	lipase/hydrolase family protein (CO984629.1_487)	5,16
23410	NAC3 protein (BE821995.1_457)	6,29
23030	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase (GMFL01-14-C22-R_450)	-6,36
39080	beta-1,3-glucanase-like protein (CD396678.1_451)	6,6
32523	Desconhecido (GMFL01-51-F01-F_362)	5,74
3468	Desconhecida (AW780907.1_449)	8,26
18747	Desconhecida (BF219543.1_471)	-6,36
15014	arabinogalactan protein (B471377.1_391)	4,2
13922	sorbitol-like transporter (BI974666.1_464)	4,92
35092	Desconhecida (AW309904.1_240)	-5,67
8878	Desconhecido (GMFL01-18-B01-R_500)	-6,78
4284	ribosomal protein S7/NADH dehydrogenase (BU965521.1_403)	-9,01
5059	Proteína desconhecida (GMFL01-11-F16-F_450)	4,55
12011	nitrate transporter NRT1-1" (CD393283.1_411)	5,81
38231	Desconhecida (CD416587.1_481)	-8,35
6641	N3 protein" (BF324294.1_331)	6,57
24585	Desconhecida (BQ612497.1_574)	6,41
3292	Desconhecido (AW350538.1_469)	7,24
305	Desconhecido (BI968082.1_502)	8,25
17492	Desconhecido (CO983310.1_630)	5,34
14250	Desconhecida (BI971521.1_705)	9,03
4215	asparagine synthetase (BI946107.1_266)	6,83
13875	endo-xyloglucan transferase// product="syringolide-induced protein 19-1-5 (CX548488.1_6080)	4,79
19305	Desconhecido (GMFL01-41-M08-R_299)	-7,06
895	Desconhecida (GMFL01-20-P12-R_461)	5,15
16768	Desconhecido (GMFL01-26-F11-R_414)	7,31
5979	Desconhecido (GMFL01-19-L24-R_546)	-8,54

Tabela 5. (Continuação) Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P1333 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle. nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
26846	Syringolide-induced protein 19-1-5 (CO983719.1_611)	6,94
23475	Heat shock domínio N-terminal (CO982586.1_718)	4,98
39298	Aluminum ativado por transportador de malato (BU083708.1_414)	3,06
20680	Desconhecida (GMFL01-10-J09-R_509)	7,9
13881	Família GDSL-lipase/hydrolase (CD402808.1_546)	-8,37
27369	Glycyl tRNA sintetase (GMFL01-10-G10-R_478)	-8,84
38118	Plastocianina (CA800350.1_653)	7,05
37343	Desconhecida (GMFL01-02-E06-R_443)	6,98
14738	Proteína beclin 1 (GMFL01-15-N05-R_489)	14,43
1456	Desconhecida (CD405456.1_510)	-8,93
7495	Syringolide-induced protein 19-1-5 (AW349280.1_651)	6,52
25441	Malato desidrogenase (Mdh1) (CD412730.1_117)	-6,26
26644	Proteína de parede celular rica em prolina (BE821485.1_111)	-5,17
5099	Subunidade ribossomal 60S (GMFL01-08-E24-R_408)	-6,36
10342	Transportador de íons ferro (CX703023.1_785)	12,34
20348	Proteína de tolerância à sal (BG239774.1_305)	-6,45
2493	Sacarose-fosfato sintase (GMFL01-52-F01-R_375)	7,25
8503	Xiloglucana endotransglicosilase (GMFL01-22-A11-R_322)	-7,51
9544	Desconhecida (GMFL01-24-K12-R_172)	-7,5
10086	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (GMFL01-10-E03-R_618)	6,12
19522	Transportador de cálcio do retículo endoplasmático (GMFL01-17-L18-R_21)	6,71
4579	Celulose sintase (CX703131.1_676)	6,42
7704	Promotor do crescimento independente de auxina (GMFL01-09-P08-R_624)	-8,85
27960	Desconhecida (GMFL01-13-P05-R_651)	5,38
23918	Glicina tirosina keratina (CD405449.1_188)	5,34
39983	Quitinase classe I (AW350972.1_632)	8,44
16601	Proteína dedo de zinco - CCCH (BE822876.1_588)	-8,52
2764	Celulose sintase/ transferase (BE822543.1_565)	7,49
1485	Desconhecida (GMFL01-43-A03-R_452)	-5,14
9878	Desconhecida (BE821892.1_534)	-5,84
9434	Desconhecida (GMFL01-13-D10-R_1)	13,28
23021	Syringolide-induced protein B13-1-1 (CO982385.1_770)	6,88
6957	Proteína BURP - maturação de semente (CD400847.1_561)	-5,03
331	fosfoenolpiruvate carboxilase kinase 4 (BI968464.1_575)	4,34
22623	Família metiladenine glicosilase (BI970662.1_699)	6,01
17334	Glicoproteína rica em hidroxiprolina (CA784277.1_521)	6,61
21939	Osmotina (AW348587.1_616)	6,31
26014	Proteína BURP - maturação de semente (CO983090.1_714)	7
11722	Homeodomain zipper de leucina (BQ629441.1_466)	5,04
12601	Desconhecida (CD397229.1_423)	-6,22

Tabela 5. (Continuação) Lista dos genes diferencialmente expressos no evento de soja P1333 com 15% de UG. A BR16 (não transformada) foi usada como controle. nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

Chip Acesso	Similaridade*	Expressão
21187	LRR-kinase (BE347792.1_384)	5,26
30102	Proteína de ligação a lipídeos (BQ785497.1_465)	5,98
19186	Transportador ABC (GMFL01-15-M15-R_670)	-8,32
8877	Desconhecida (GMFL01-19-A21-R_538)	9,93
42044	Proteína de ligação a cauda poly(A) (CX547053.1_444)	-5,71
15545	poligalacturonase (CA937935.1_396)	-3,7
15880	rRNA (GMFL01-26-B18-R_422)	6,5
10724	Desconhecida (GMFL01-27-E10-R_314)	-6,93
39531	UDP-glucose desidrogenase (GMFL01-42-E14-R_193)	-5,82
8122	Proteína dedo de zinco - CCCH (A1988452.1_443)	-5,57
10140	Proteína dedo de zinco (CD409737.1_537)	-5,22
38471	Endo-xiloglucana transferase (CD406004.1_556)	5,93
34701	Fator de transcrição MADS (GMFL01-10-M15-R_587)	12
6499	Ubiquitina (GMFL01-45-O09-R_448)	8,8
37848	Transportador de íons ferro DMT1 (BQ474089.1_349)	9,58
26853	Retroelemento (GMFL01-40-M18-F_288)	-6,4
11321	Proteína induzida por luz (BU089985.1_432)	9,26
13331	Desconhecida (GMFL01-30-A21-F_610)	6,69
34783	Tioredoxina (BI971002.1_612)	5,18
23810	Elicitor Avr9/Cf-9 (GMFL01-29-E08-R_534)	11,93
25858	Desconhecida (CX702424.1_569)	6,62
23121	Proteína dedo de zinco (Ran-binding) (BQ079975.1_476)	5,19
29815	Desconhecida (GMFL01-29-F18-R_273)	11,49
33228	LYK10 (BE823333.1_577)	5,62
6502	Desconhecida (CO982924.1_532)	5,76

* Similaridade pelo blastx (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Nível de expressão dos genes identificados como diferencialmente expressos. Sinais positivos="up"-regulados, sinais negativos="down"-regulados.

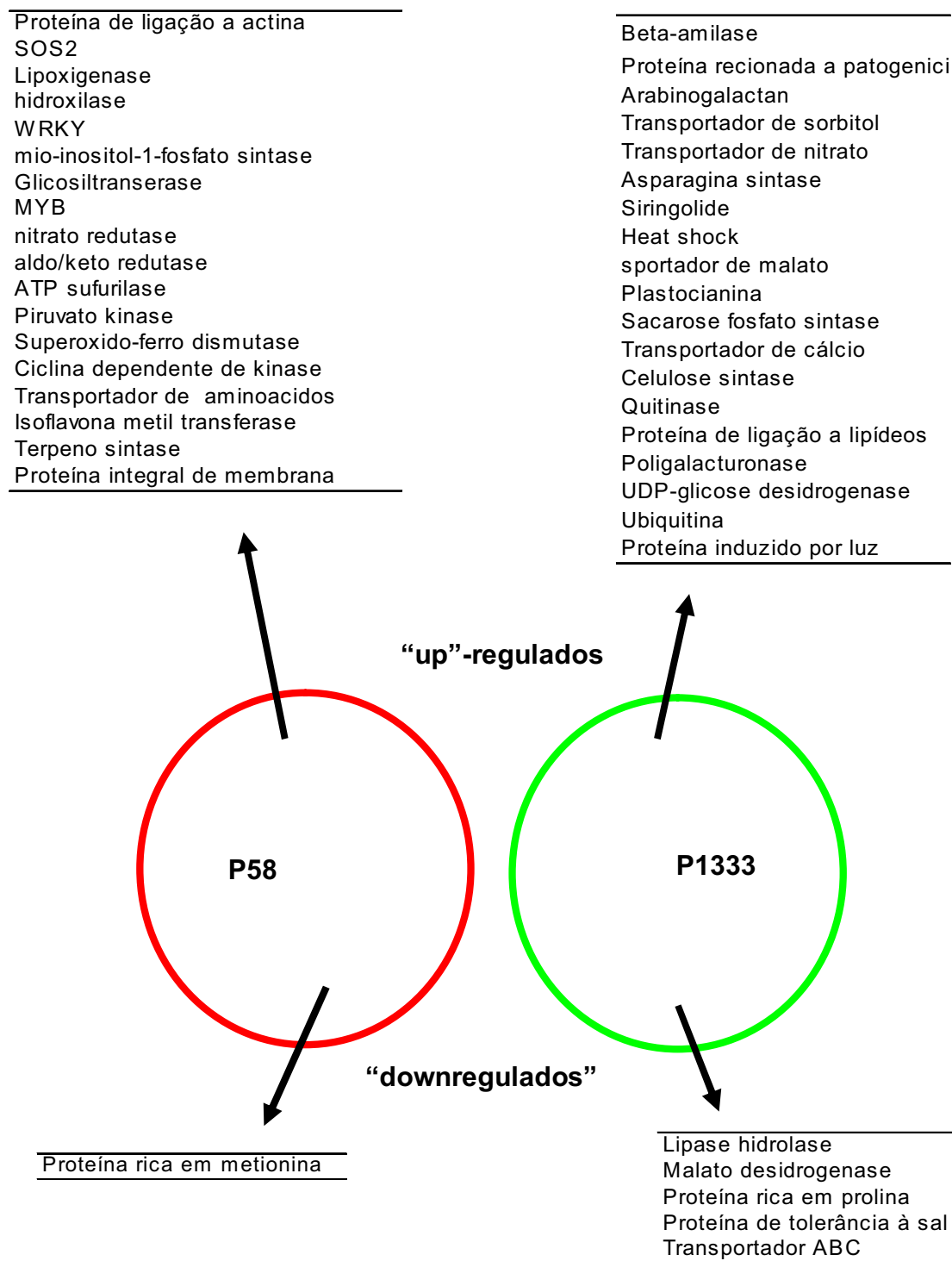


Figura 4. Representação dos genes diferencialmente expressos exclusivos de cada evento de soja, P58 e P1333, “up” e “down”-regulados. A cultivar BR16 (não transformada) foi usada como controle nas análises de microarranjos de oligonucleotídeos.

3.3.3 Análises fisiológicas

Nas avaliações feitas nos estádios iniciais de desenvolvimento, diferenças estatísticas significativas na taxa fotossintética não foram observadas nos eventos transformados entre os tratamentos (15% e 2,5% de UG), mostrando que o estresse foi suficiente para ativar o gene *Atdreb1a*, mas não o suficiente para interferir na taxa fotossintética nesse estágio de desenvolvimento (Figura 5A). A condutância estomática foi diferente no evento P1333, sendo menor no tratamento com 2,5% de UG assim como nas plantas controle (BR16) (Figura 5B). A taxa de transpiração não apresentou diferenças entre os tratamentos (15% e 2,5% de UG) nos eventos transformados com o gene *Atdreb1a* (Figura 5C). O perfil da concentração intercelular de CO₂ foi similar ao da taxa de transpiração (Figura 5D).

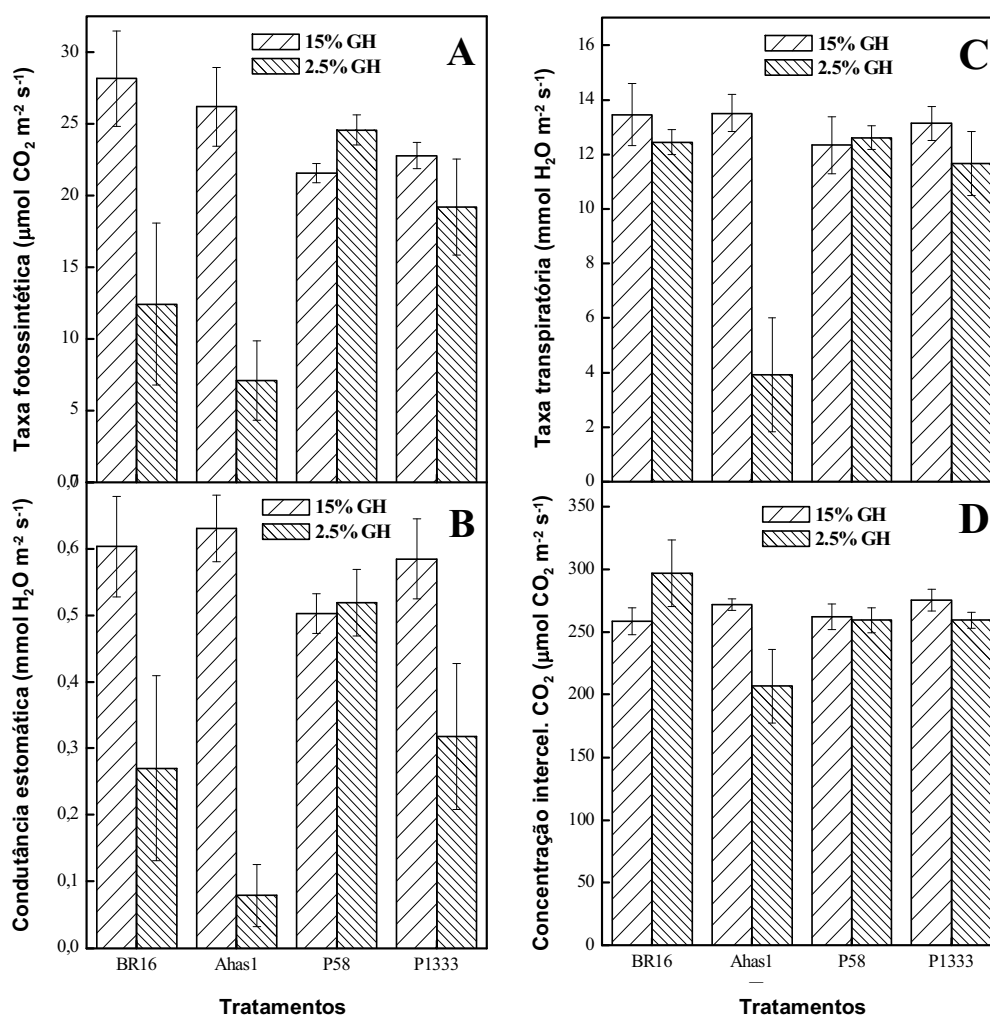


Figura 5. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e concentração intercelular de CO₂ (D), nos eventos transformados com a construção *rd29a: dreb1a* comparada com a BR16 (não transgência) submetida aos tratamentos de estresse (15% e 2,5% de UG). Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O círculo representa o tratamento que não apresentou diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey.

Análises de macro e micronutrientes feitas nos eventos P58 e P1333 indicaram diferenças estatísticas significativas no teor de P, K, Ca, Mg e Fe em relação a planta controle (BR16), apresentando redução das taxas nutricionais nas plantas na condição estressada (2,5% de UG), embora as plantas transformadas tenham apresentado maiores valores em relação a planta controle (BR16) (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração de macronutrientes e micronutrientes em eventos de soja transformados com a construção *rd29a: dreb1a*, P58 e P13333, e BR16 não transformada (controle) na condição controle (15% de UG) e durante déficit hídrico severo (2,5% de UG). Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Macronutrientes (g 100 g ⁻¹)											
Tratamentos	N		P		K		Ca		Mg		S
BR16 15%	31,27	a	1,20	b	7,08	b	8,78	b	3,15	b	1,85 a
P58 15%	37,87	a	1,50	a	8,52	b	12,81	a	3,96	a	2,04 a
P1333 15%	33,53	a	1,56	a	9,48	a	10,54	b	3,73	a	2,26 a
BR16 2,5%	31,97	a	0,98	b	9,42	a	8,28	b	3,78	a	1,87 a
P58 2,5%	32,40	a	1,05	b	10,08	a	9,31	b	3,63	a	2,20 a
P1333 2,5%	36,03	a	1,04	b	10,38	a	8,36	b	3,73	a	2,08 a
CV%	11,20		12,97		8,91		9,32		5,08		14,79
Micronutrientes (µg g ⁻¹)											
Tratamentos	Zn		Mn		Fe		Cu		B		
BR16 15%	22,41	b	154,73	a	164	a	1,69	a	14,93	a	
P58 15%	23,84	b	158,01	a	157	a	2,97	a	21,87	a	
P1333 15%	26,84	b	144,06	a	141	b	2,96	a	22,23	a	
BR16 2,5%	17,28	b	136,43	a	127	b	2,03	a	24,60	a	
P58 2,5%	22,47	b	155,86	a	148	a	2,37	a	20,73	a	
P1333 2,5%	24,43	b	118,05	a	161	a	2,39	a	25,37	a	
CV%	24,08		15,27		11,18		18,31		23,53		

O controle transcricional é o principal mecanismo no qual uma célula ou um organismo regula a expressão gênica. Sequências de reguladores específicos que se ligam ao DNA desempenham um papel essencial na modulação da taxa de transcrição de genes alvo específicos, atuando diretamente no controle da expressão temporal e espacial, necessárias para o desenvolvimento normal e adequado da resposta a estímulos fisiológicos e ambientais. Todas as mudanças fisiológicas em plantas, portanto, têm uma base molecular. Cultivares que diferem na tolerância ao déficit hídrico deve apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica.

A partir dos resultados obtidos nas plantas transformadas com o gene *Atdreb1a*, que apresentaram maior tolerância à seca, através de análises fisiológicas e da própria super-expressão do gene *Atdreb1a*, foi possível identificar genes diferencialmente expressos “up” e “down”-regulados pelo gene *Atdreb1a* em condição normal do nível de água no solo, ou seja, em plantas com 15% de UG. A regulação desses genes fornece uma visão geral de alguns mecanismos envolvidos no processo de tolerância à seca nessas plantas de soja.

Genes “up”-regulados identificados em ambos os eventos analisados, como por exemplo, o que codifica a enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) tem um papel fundamental no metabolismo fotossintético. Sabe-se que em condições de estresse hídrico o fechamento dos estômatos limita a difusão do CO₂ do meio externo para o mesofilo da folha, ocasionando uma redução da pressão parcial de CO₂ no seu interior (NEVES et al., 2006). Uma das primeiras consequências dessa redução é o aumento da atividade oxigenase da enzima Rubisco, para produzir 3-fosfoglicerato e fosfoglicolato, promovendo o estímulo da fotorrespiração. Esse processo reduz a eficiência da fotossíntese porque desvia parte do poder redutor das reações dependentes da luz e não gera nenhum ATP (BERNACCHI et al., 2001). Além disso, a elevada atividade oxigenase da enzima Rubisco aumenta os valores do ponto de compensação do CO₂. Embora a taxa fotossintética e a condutância estomática não tenham diferido entre os tratamentos de déficit hídrico nos eventos avaliados, os valores desses parâmetros foram inferiores aos da cultivar BR16 (não transformada), usada como controle (Figura 5).

Mesmo com altos níveis da enzima Rubisco e, conseqüentemente, uma menor eficiência fotossintética comparada a cultivar controle, a presença do gene *Atdreb1a*, possibilitou, provavelmente, a ativação de outros genes envolvidos na manutenção do metabolismo fotossintético e secundário dessas plantas, como por exemplo, a ativação de ATPases, kinases, fosfatases.

Um outro gene “up”-regulado nos dois eventos faz parte da família NAC que é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas (OLSEN et al., 2005). Genes dessa família participam de vários processos biológicos incluindo o desenvolvimento e a resposta a estresses bióticos e abióticos (GUO et al., 2005). No caso dos eventos estudados nesse trabalho foi identificado o gene NAC3, assim como e em trabalho anterior feito com *A. thaliana*, onde foi mostrado o domínio conservado dessa proteína na extremidade N-terminal (ERNEST et al., 2004).

Alguns genes que foram identificados como “up”-regulados apenas no evento P58, como o gene *sos2* (“Salt overly sensitive”) que participa da resposta ao estresse salino em plantas e tem um papel fundamental na regulação dos transportadores de íons como Na^+ e K^+ , bem como no processo de fosforilação desses íons (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). A expressão de *sos2* na ausência de estresse, como foi observada nesse trabalho, é consistente com o papel principal de transdução de sinal, promovendo a adaptação ao estresse. Isso pode ser confirmado pela manutenção do nível de potássio nas plantas do evento P58 em relação às plantas do evento P1333, as quais apresentaram aumento do nível de K^+ em 15% de UG (Tabela 6). O K^+ é requerido para a manutenção do balanço osmótico, na regulação da abertura e fechamento estomáticos e é essencial como co-fator de muitas enzimas como a piruvato kinase, enzima também identificada nesse evento de soja transformado (BECK et al., 2007). O rápido aumento dos níveis de *sos2* pode ser importante para manter um nível suficiente desse íon durante o estresse, tanto salino quanto em resposta à seca, frio, pois todos eles promovem uma desidratação celular, comprometendo a homeostase da célula (EMSMINGER et al., 2006). Domínios específicos de proteínas kinase têm a função de proteger as células contra estresses ambientais que reduzem a produção de ATP, regulando o metabolismo e a expressão gênica (MAHAJAN & TUTEJA, 2006).

Parte da regulação do domínio do gene *sos2* é semelhante à proteína de reparo do DNA e à replicação dependente de kinase CHK1, necessária para a atividade do ciclo celular em resposta a danos no DNA (TUBEROS & SALVI, 2006).

Além desses genes citados acima, a família de proteínas WRKY que contém um ou dois domínios altamente conservados caracterizados pelo WRKYGQK e um dedo de zinco, foi identificada no evento P58. Nas plantas, muitas proteínas WRKY estão envolvidas na defesa contra o ataque de bactérias patogênicas, fungos, vírus, e oomycetos (WANG et al., 2005). Além disso, genes WRKY estão envolvidos em respostas a estresses abióticos, como ferimento, a combinação de seca e calor, e frio (EULGEM, 2005). Também é evidente que alguns membros da família podem desempenhar importante papel regulador na morfogênese de tricomas e embriões, senescência, dormência e crescimento vegetal (ZANG & WANG, 2005).

Genes “down”-regulados incluem o fator de transcrição contendo domínios dedo de zinco, como o *ccch*, identificado em ambos os eventos, e o gene que codifica a enzima malato sintase, esse último identificado apenas no evento P1333. A enzima malato desidrogenase atua com a fosfoenolpiruvato carboxilase, para a redução de oxaloacetado a malato, utilizando NAD como doador ou receptor de elétrons nessas reações, tendo uma importante função no Ciclo de Krebs (mitocôndria) para a produção de NADH (SANTOS et al., 2004) e, consequentemente produção de energia celular.

Entre os genes identificados como “up”-regulados apenas no evento P1333 destaca-se o fator de transcrição *siringolide*, que é um elicitor que funciona no reconhecimento do patógeno, através da ligação a uma proteína citoplasmática que está presente em cultivares de soja resistente e suscetível a *Pseudomonas* (Rpg4/rpg4). No processo de reconhecimento e sinalização há a ativação de vários processos bioquímicos como a ativação de outros genes de defesa, a biossíntese de fitoalexinas, a geração de espécies ativas de oxigênio (ROS) (SLAYMAKER & KEEN, 2003). Provavelmente, a participação do gene *siringolide* no processo de tolerância à seca em plantas de soja estudadas nesse trabalho esteja relacionada também com essa indução da expressão de genes, como proteínas MAP-kinases de resposta ao estresse, ROS e outros processos ainda

desconhecidos, mas que são comuns para estresses bióticos e abióticos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROCA, R.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; CHRISPEELS, M. Drought, Absciscic Acid and Transpiration Rate Effects on the Regulation of PIP Aquaporin Gene Expression and Abundance in *Phaseolus vulgaris*. **Plants Annals of Botany**, v. 98, p. 1301–1310, 2006.

BECK, E. H.; FETTIG, S.; KNAKE, C.; HARTIG, K.; BHATTARAI, T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **Journal of Bioscience**, v. 32, n. 3, 2007.

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. **Dissertação** (Universidade Estadual De Londrina), 2006.

BERNACCHI, C. J.; SINGSAAS, E. L.; PIMENTEL, C.; PORTIS JUNIOR, A. R.; LONG, S. P. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 253-259, 2001.

BOTA, J.; MEDDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decrease Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, v. 162, p. 671-681, 2004.

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

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

CHEN, L.; MARMEY, P.; TAYLOR, N. J.; BRIZARD, J.; ESPINOZA, C.; D'CRUZ, P.; HUET, H.; ZHANG, S.; DE KOCHKO, A.; BEACHY, R. N.; FAQUET, C. M. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature**

Biotechnimistry, v. 16, p. 1060-1064, 1998.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Sciences**, v. 5, p. 187-188, 2000.

DEYHOLOS, M., GALBRAITH, D. W. High-density microarrays for gene expression analysis. **Cytometry**, v. 43, p. 229–238, 2001.

DUBOUZET, J. G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E. G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt and cold- responsive gene expression. **Plant Journal**, v. 33, p. 751–763, 2003.

DUNWELL, J. M. Transgenic Approaches to Crop Improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 487-496, 2000.

EMSMINGER, I.; BUSCH, F.; HUNER, N. P. A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. **Physiology Plant**, v. 126, p. 28 –44, 2006.

ERNEST, H. A.; OLSEN, A. N.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of NAC family of transcription factors. **Embo Reporter**, v. 5, p. 297-303, 2004.

EULGEM, T. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. **Trends Plant Science**, v. 10, p. 71-78, 2005.

FOWLER, S. G.; THOMASHOW, M. F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1675–1690, 2002.

GILMOUR, S. J.; SEBOLT, 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**, v. 124, p. 1854–1865, 2000.

GIRKE, T.; TODD, J.; RUUSKA, S.; WHITE, J.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Microarray Analysis of Developing Arabidopsis Seeds. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1570-1581, 2000.

GUO, H. S.; XIE, Q.; FEI, J. F.; CHUA, N. H. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral

roots development. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1376-1386, 2005.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 141–153, 2006.

JONES, H. G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 119-130, 2007.

KALEFETOĞLU, T.; EKMEKÇİ, Y. The Effects of Drought on Plants And Tolerance Mechanisms (Review). **Journal of Science**, v. 18, n. 4, p. 723-740, 2005.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature America**, p. 287-291, 1999.

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**, v. 45, n. 3, p. 346-350, 2004.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H. J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**, v. 13, p. 889–905, 2001.

KEIM, P.; OLSON, T. C.; SHOEMAKER, R. C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetic Newsletter**, v. 15, p. 150, 1988.

KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proceeding National Academic Science**, v. 95, p. 7203-7208, 1998.

KREPS, J. A.; WU, Y.; CHANG, H. S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J. F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2129–2141, 2002.

LAFITTE, H. R.; YONGSHENG, G.; YAN, S.; LI, Z.-K. Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice. **Journal of**

Experimental Botany, v. 58, n. 2, p. 169-175, 2007.

LEHANE J. J.; STAPLE, W. J. Influence of soil texture, depth of soil moisture storage, and rainfall distribution on wheat yields in southwestern Saskatchewan. **Journal of Soil Science**, v. 45, p. 207-219, 1965.

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

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

LIZANA, C.; WENTWORTH, M.; MARTINEZ, J. P.; VILLEGAS, D.; MENESES, R.; MURCHIE, E. H.; PASTENES, C.; LERCARI, B.; VERNIERI, P.; HORTON, P.; PINTO, M. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. I. Effects of drought on yield and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 685-697, 2006.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, n.2, p. 139-158, 2005

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives Biochemestry and Biophysic**, v. 444, p. 139 –158, 2006.

MULLER, J.E.; WHITSHITT, M.S. Plant cellular responses to water deficit. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 41-46, 1996.

NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; SEKI, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high salinity- responsive gene expression. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 657–665, 2000.

NEVES, A. D.; OLIVEIRA, R. F.; PARRA, J. R. P. A new concept for insect damage evaluation based on plant physiological variables. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, 2006.

OMIRULLEH, S.; ÁBRAHÁM, M.; GOLOVKIN, M.; STEFANOV, I.; KARABEV, M. K.; MUSTÁRDY, L.; MÓROCZ, S.; DUDITS, D. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. **Plant Molecular Biology**, p. 415-428, 2004.

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

OZTURK, Z. N.; TALAME, V.; DEYHOLOS, M.; MICHALOWSKI, C. B.; GALBRAITH, D. W.; GOZUKIRMIZI, N.; TUBEROSA, R.; BOHNERT, H. J. Monitoring large scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 551–573, 2002.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P. J.; KEYS, A. J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v. 89, p. 833-839, 2002.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting Agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, v. 136, p.167-179, 2004.

PAWLOWSKI, W. P.; SOMERS, D. A. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. **Proceedings National Academic Science**, v. 95, p. 12106-12110, 1998.

POLIZEL, A. M. Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção rd29A: DREB1A, de Arabidopsis thaliana, visando tolerância à seca. **Dissertação** (Universidade Estadual de Londrina), 2007.

RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Absciscic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1755–1767, 2003.

REDDY, M. S. S.; DINKINS, R. D.; COLLINS, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. **Plant Cell Reporter**, v. 21, p.

676-683, 2003.

REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E. E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 12, p. 707–719, 2000.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Physiologic and biochemical alterations in artificially aged bean seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, 2004.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. C.; MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceeding National Academic Science**, v. 97, p. 11655–11660, 2000.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; ANDERSON, J. P.; SIMPSON, B.; WILSON, I.; SOMERVILLE, S. C.; MACLEAN, D. J. Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 999–1010, 2003.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ABE, H.; KASUGA, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses using full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, v. 13, p. 61–72, 2001.

SHEN, Y. G.; ZHANG, W. K.; YAN, D. Q.; DU, B. X.; ZHANG, J. S.; LIU, Q.; CHEN, S. Y. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. **Theoretical Applied Genetic**, v. 107, p.155–161, 2003.

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

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

SLAYMAKER, D.; KEEN, N. T. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins. **Plant Science**, v. 166, p. 387-396, 2003.

STOLF, R.; MEDRI, M. E.; LEMOS, N. G.; NEUMAIER, N.; BINNECK, E.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. C. N. DE, FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. Physiological responses and differential gene-expression analysis in two contrasting soybean genotypes during drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. In press.

TEZZARA, W.; MITCHELL, V. J.; DISCROLL, S. D.; LAWLOR, D. W. Effect of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1781-1791, 2002.

TEZARA, W.; MARTÍNEZ, D.; RENGIFO, E.; HERRERA, A. Photosynthetic Responses of the Tropical Spiny Shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to Drought, Soil Salinity and Saline Spray. **Annals of Botany**, v. 92, p. 757-765. 2003.

THIMM, O., ESSIGMANN, B., KLOSKA, S., ALTMANN, T., BUCKHOUT, T. J. Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1030–1043, 2001.

THIMMANIAK, S.; GIRIDARA, K. S.; JYOSTHANA, K. G.; SURYANARAYANA, N. SUHAKAR, C. Photosynthesis and the enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in mulberry during water stress and recovery. **Photosynthetica**, v. 40, p. 233-236, 2002.

TRAN, L-S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S. D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 49, p. 46–63, 2007.

TREWAVAS, A. Aspects of plant intelligence. **Annals of Botany**, v. 92, p. 1-20, 2003.

VANDELEUR, R.; NIEMITZ, C.; TILBROOK, J.; TYERMAN S. D. Roles of aquaporines in root responses to irrigation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 141-161, 2005.

TUBEROSA, R.; SALVI, S. Genomic-based approaches to improve drought tolerance of crops. **TIPS**, v. 11, p. 405 –412, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Characterization of the expression

of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Molecular Genetic**, v. 236, p. 331-340, 1993.

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

WALTERS, D. A.; VETSCH, C. S.; POTTS, D. E.; LUNDQUIST, R. C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 189-200, 1992.

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

WANG, D.; WEAVER, N. D.; KESARWANI, M.; DONG, X. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. **Science**, v. 308, p. 1036-1040, 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**, v. 135, p. 1-7, 2004.

ZHANG, Y.; WANG, L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, 2005.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO II

PERFIL TRANSCRICIONAL DA RAIZ DE SOJA [*Glycine max* (L.) MERRILL] EM RESPOSTA À SECA

RESUMO - O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca é de importância fundamental no planejamento de estratégias para o controle da intensidade do estresse e, conseqüentemente, para a adaptação das plantas a essa condição limitante. Análises de expressão de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos mostram a existência de diversos sistemas regulatórios estresse-responsivos. O objetivo desse trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos na soja, em genótipos contrastantes em diferentes condições de seca. A partir de uma biblioteca de cDNA construída com amostras de raízes sob diferentes intensidades de estresse hídrico, 753 clones não redundantes foram identificados por comparação com as seqüências depositadas no “GenBank”. Esses clones foram amplificados por PCR e impressos nas lâminas de microarranjos. Para construção das sondas foram feitos “bulks” de RNA total dos tratamentos T₂₅ e T₅₀ (raízes submetidas a 25 e 50 minutos de estresse) e T₇₅ e T₁₀₀ (raízes submetidas a 75 e 100 minutos de estresse), utilizando-se o tratamento T₀ (sem estresse) como controle em ambos os “bulks”. Os resultados indicam expressão diferencial de 145 genes que codificam proteínas envolvidas direta e/ou indiretamente em rotas metabólicas de resposta a estresses bióticos e abióticos. Os grupos de genes identificados como diferencialmente expressos durante os tratamentos aplicados foram classificados em nove categorias funcionais, entre elas energia, fator de transcrição, metabolismo, resposta a estresses, síntese de proteínas, comunicação celular, ciclo celular, transporte celular e desconhecida. Os dados de microarranjos foram confirmados através da quantificação relativa por RT-qPCR para nove genes.

PALAVRAS-CHAVE: déficit hídrico, expressão gênica diferencial, leguminosa, microarranjos, PCR quantitativo em tempo real.

1 INTRODUÇÃO

A seca é um dos principais fatores ambientais que limita a produção das culturas e a distribuição das plantas por todo o mundo (GORANTLA et al., 2007). Nos últimos anos, estresses abióticos causaram perdas na produção de mais de 50% (BRAY, 2004) e apenas a seca, segundo estimativas, tem causado perdas no campo de mais de 15% (POROYKO et al., 2007). Trabalhos anteriores 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 (HASEGAWA et al., 2000; 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, respostas da planta à seca são complexas, envolvendo a expressão de genes que implicam na coordenação e na integração de múltiplas vias bioquímicas que contribuem para a adaptação das plantas na condição de seca (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 kinases e fosfatases, e 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 prospecções 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.

A técnica de microarranjos de DNA tem produzido resultados significativos no perfil de expressão gênica. Uma das maiores vantagens da utilização da técnica é a análise simultânea de um grande número de genes e de amostras (HALL et al., 2000; BUSTIN, 2000; OONO et al., 2003), sendo, portanto, um meio para se explorar o controle metabólico e genético da expressão gênica numa escala genômica (DERISI et al., 1997). Outras vantagens incluem a capacidade de analisar padrões de expressão de uma forma paralela, a interpretação imediata dos resultados de hibridização e a possibilidade de analisar a expressão de genes desconhecidos com seqüências contidas em bancos de dados (YAMADA et al., 2003). Para complementar e confirmar os resultados gerados pelos microarranjos, tem sido utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), que é mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene (GINZINGER, 2002).

Como um ponto inicial para entender os mecanismos moleculares chaves que envolvem a tolerância à seca, foi realizado um experimento para determinar os efeitos da seca em cultivares de soja tolerante e sensível, usando arranjos construídos a partir de uma biblioteca de cDNA de raízes submetidas a diferentes intensidades de déficit hídrico. O objetivo do trabalho foi, portanto, identificar genes diferencialmente expressos em resposta à seca em soja, categorizar os genes de acordo com a função biológica, localizá-los, como produto de sua expressão, em prováveis rotas metabólicas e verificar possíveis diferenças na expressão desses genes nos genótipos contrastantes à seca.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento Experimental para as Sondas dos Microarranjos de cDNA

Sementes de duas cultivares de soja, MG/BR46 (Conquista) e BR16, tolerante e sensível à seca (OYA et al., 2004), respectivamente, foram germinadas em câmara de germinação climatizada e, posteriormente, as plântulas foram transferidas para o sistema de hidroponia contendo solução nutritiva (HEWITT, 1963). Cada tratamento foi representado por 30 plantas, totalizando 120 plantas no experimento. As plantas foram crescidas por três semanas em casa de vegetação (dia $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$; noite $22\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR $40\%\pm 5\%$), em delineamento em blocos ao acaso, e o estresse hídrico foi aplicado quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento vegetativo V_3 , aproximadamente 21 dias após a germinação. As plantas foram submetidas aos tratamentos de déficit hídrico por vários períodos (0, 25, 50, 75 e 100 minutos), e as raízes foram coletadas, em cada período, para as análises moleculares. A extração do RNA total foi feita utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo recomendações do fabricante.

O monitoramento dos tratamentos aplicados foi feito através de avaliações fisiológicas, analisando-se as variáveis: taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$), estimadas pelo equipamento portátil de fotossíntese “Photosynthesis System” (LICor, Inc., model LI-6400), usando o folíolo mediano do segundo nó foliar (do ápice em relação à base) completamente expandido sob intensidade luminosa de aproximadamente $1.000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A análise de variância (ANOVA) dos dados fisiológicos foi feita usando o programa SAS versão 8.0 comparando-se as diferenças entre os tratamentos e cultivares. As diferenças de médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p\leq 0.05$).

2.2 Microarranjos de cDNA: Confecção, Hibridização e Análise

2.2.1 Construção dos microarranjos de cDNA

Os clones da biblioteca de cDNA selecionados para composição dos microarranjos foram amplificados independentemente por PCR. Para cada clone foi feita uma reação de PCR de 50 μ L, contendo aproximadamente 25 ng de DNA, 0,1 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada “primer” (“Foward”: 5'-CCGAGATCTGGACGAGCTT-3' e “Reverse”: 5'-GCTTAACCGGTTCACTCG-3'), $MgCl_2$ 2,4 mM, DMSO (Dimetilsulfóxido) 0,25%, tampão de reação (1x) e 0,04U/ μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As condições de amplificação corresponderam a um passo de 10 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 73°C por 30 s e 68°C por 1 min, e um passo final de 10 min a 72°C. Uma alíquota do produto de PCR foi corrida em gel de agarose 1%, para verificar a presença de uma única banda.

Do produto de amplificação de cada clone, 30 μ L, correspondendo a aproximadamente 3 μ g de DNA, foram dispostos em placas de poliestireno de 96 poços e misturados numa proporção de 1:1 (v:v) com DMSO. As amostras de DNA obtidas foram impressas em lâminas de vidro CMT-GAPS2 (Corning, New York, USA), tratadas com aminolisina, que permite a ligação covalente da extremidade NH_4^+ com a extremidade PO_4^- do DNA, em duplicata usando o equipamento “GMS-417 Arrayer” (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

2.2.2 Síntese de cDNAs marcados com fluoróforos

Foi utilizada a técnica de marcação direta do cDNA durante a transcrição reversa, utilizando os fluoróforos “Cy3” (verde) e “Cy5” (vermelha). Para marcação, 20 μ g de RNA total de cada amostra, foi misturado a 40U/ μ L de RNAsin (Promega, Madison, WI, USA), 15 μ g de “primer” randômico pd(N)6 (Amershan Bioscience, Sunnyvale, CA, USA) e 5 μ g de oligodT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi incubada a 70°C por 10 min e rapidamente resfriada a 4°C. A amostra de RNA foi misturada com tampão de reação (1x) (Invitrogen), DTT 10 mM, dNTP mix (0,25 mM dATP, dGTP, dCTP; 0,1 mM dTTP), Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP 1,25 mM (Amershan Bioscience, Sunnyvale, CA, USA), e 20U da transcriptase reversa “RT-Superscript II”

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A síntese do cDNA foi efetuada a 37°C durante 3h, na ausência de luz, e o RNA molde foi posteriormente hidrolisado através da incubação com NaOH 1M a 37°C por 40 min. A reação foi neutralizada pela adição de Tris-HCl 8M, pH 7,5. A amostra contendo cDNA marcado foi então purificada em coluna Microcon YM-100 (Millipore, USA) (SOUZA et al., 2006).

2.2.3 Hibridizações

As hibridizações foram feitas utilizando-se os tratamentos T_0 – correspondente ao controle, T_1 – “bulk” dos tempos 25 e 50 min, T_2 – “bulk” dos tempos 75 e 100 min), em pares: [T_0 (“Cy5”) + T_1 (“Cy3”)] e [T_0 (“Cy5”) + T_2 (“Cy3”)] para as duas cultivares de soja. Os pares de cDNA marcados foram misturados em solução de hibridização, contendo o líquido bloqueador RPN3601 (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, USA), SSC (20X) e SDS 2%, e pré-desnaturados a 95°C por 2 min. A hibridização ocorreu na estação “GeneTac Hybridization” (Genetic Microsystems, Woburn, MA, USA), na qual as lâminas de vidro do microarranjo foram acopladas. Cada mistura de cDNA foi distribuída sobre a lâmina e hibridizada a 42°C durante 12h. Após a hibridização, a lâmina foi lavada automaticamente e sequencialmente em SSC (2X)/SDS 0,5%, SSC (0,5X) e SSC (0,05X), a 25°C. Cada lavagem correspondeu a um período de 15 min, com 10 s de fluxo, 20 s de incubação e 15 s de secagem, durante 10 ciclos. O período de secagem da lâmina foi de 15 min. Foram utilizadas três lâminas para cada experimento, ou seja, extrações de RNA, síntese de cDNAs marcados e hibridizações foram realizadas com três repetições para cada ensaio executado.

2.2.4 Obtenção das imagens e análise dos dados

Os sinais fluorescentes foram obtidos através de um scanner “GMS-418 Arrayer” (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). As imagens obtidas foram sobrepostas e analisadas, determinando a densidade em “pixel” (intensidade) para cada spot no

microarranjo, utilizando o programa “ImaGene” versão 5.5 (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA). Uma grade de círculos independentes, correspondentes a cada spot de DNA nos arranjos foi desenhada sobre a imagem para designar cada spot a ser quantificado. A quantificação foi calculada pela mediana da intensidade de todos os “pixels” referentes ao sinal de hibridização de cada “spot”. Os “pixels” classificados como “background” foram automaticamente subtraídos pelo programa.

A localização e identificação de cada gene no arranjo foram definidas em um arquivo texto foi criado com auxílio do programa “CloneTracker 2” (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA) e os dados quantificados foram exportados e transformados pelo programa “Gene Sight” versão 5.5 (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA). A normalização foi realizada seguindo os parâmetros de correção “lowess” (“locally weighted linear regression/robust locally weighted regression/local polynomial regression”) (CLEVELAND, 1979), com um método de normalização local (o algoritmo é aplicado em “subsets” físicos dos dados, isto é, um “subgrid”).

Após a normalização, os dados das repetições dos microarranjos, independentes para o mesmo experimento, foram processados pela ferramenta estatística SAM (“Significance Analysis of Microarray” – CHU et al., 2001). Essa análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção em larga escala de genes diferencialmente expressos (TUSHER et al., 2001). Os genes encontrados nos ensaios realizados foram categorizados através do “Gene Ontology” (GO) pelos programas “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (Kegg), “The Arabidopsis Information Resource (Tair) e Munich Information Center for Protein Sequence” (MIPs), dentro do esquema “Functional Category” (FunCat) para determinação do grupo funcional ao qual pertencem. Os genes de soja estão distribuídos através de nove diferentes categorias funcionais, de acordo com suas funções celulares. Após o processamento, as seqüências identificadas como diferencialmente expressas e os dados sobre o experimento foram depositadas no “GenBank”, no banco de ESTs (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov) seguindo os padrões MIAME (informação mínima sobre os dados de microarranjos) (BRAZMA et al., 2001).

2.3 PCR Quantitativo em Tempo Real

As reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas, em termociclador “7300 Real Time System” (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), utilizando-se o “kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. Os genes utilizados foram escolhidos pelos resultados do microarranjos de cDNA, verificando a provável localização desses genes em rotas metabólicas de resposta a estresses abióticos. Os números de acesso descritos foram obtidos pela busca de similaridade no NCBI, entre eles: *Gmc2h2*, *Gmnac2*, *Gmerd1*, *Gmsiringolide A*, *Gmsiringolide B*, *Gmmet*, *Gmp450*, *Gmcpn10*, *Gmlea14*. Os primers foram desenhados pelo programa “Primer Express”, versão 3.0.

Na Tabela 1 estão representados a seqüência dos “primers” e o tamanho estimado dos fragmentos gerados. Os parâmetros de ciclagem para as reações foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e então 45 ciclos de 95°C por 2 min, 62°C por 30 s e 72°C por 30 s. Como normalizador, em cada tratamento, utilizou-se o gene *Gmβ-Actina* para normalização das amostras (STOLF et al., in press a). Após a quantificação relativa, foi feita uma curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado. Temperaturas de dissociação do amplicon variando de 78°C a 85°C indicam amplificação de produto específico (alvo), abaixo dessa temperatura significa contaminação ou formação de dímeros de “primers” na reação. Para calcular a eficiência da reação foi usada a fórmula: $E = [10^{-1/\text{solpe}}] - 1$. O experimento foi montado em triplicata e com duas repetições biológicas para cada gene e tratamento em estudo. Os resultados foram analisados pelo programa “Sequence Detection” (Perkin Elmer, Massachusetts, CA, USA), usando como calibrador as plantas em 15% de UG, baseado no cálculo do delta Ct para os valores de expressão relativa. Com os dados de quantificação relativa dos genes foram realizadas as análises exploratórias para verificar se as pressuposições de normalidade, aditividade do modelo, independência dos erros e homogeneidade de variâncias dos tratamentos estavam presentes no modelo. Posteriormente foram realizadas as análises pela ANOVA para todas as

variáveis respostas. Os dois métodos foram analisados utilizando-se o programa SAS ("Statistical Analysis System") versão 8.0 e as diferenças das médias dos níveis de estresse e dos genótipos comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na RT-qPCR para os genes escolhidos a partir dos resultados de microarranjos de cDNA e o tamanho dos fragmentos gerados.

Nome dos primers e número de acesso*	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho estimado dos fragmentos (pb)
<i>Gmc2h2</i> (AAZ03389)	Fw-CGTGCCATCAAGAGTTAC Rv-TGCCCTCCCAAAGCTTTC	89
<i>Gmnac2</i> (AAY46122)	Fw-TGTCACCATTTGGCTTAGG Rv-CTGCAGCAACCGAGAG	77
<i>Gmerd1</i> (NP568750.1)	Fw-CCCTGAGAAGTCCTCCCAGCTT Rv-CACCGTACTCCGGCAAGAGC	71
<i>Gmsiringolide A</i> (AB083025)	Fw-GAGGACATAGTGAGGCA Rv-AGCCTGTGGAATGCAGAT	95
<i>Gmsiringolide B</i> (BAB86890)	Fw-TGTCACCATTTGGCTTAGG Rv-CTGCAGCAGAACCAGAG	82
<i>Gmmet</i> (AB176559)	Fw-ACCTGCAACCCCTGCACTT Rv-AGGGCCATTTCTGCTTGAAG	65
<i>Gmp450</i> (AF135485)	Fw-ACTCAAGTGCAAGCCTGTTCC Rv-CACAGTCTTCAGGCAGCGAA	71
<i>Gmcpn10</i> (NM180714)	Fw-CTTCAAACGACGCCGTAGAGAT Rv-CGGTTTTCGTTACGTTCTGCTTC	75
<i>Gmlea14</i> (CA784216)	Fw-AGTCACCAACATGCCAAGC Rv-TGCTATCTCCTGCCAGCA	96
<i>Gmb-actina</i> (GMU60500)	Fw-GAGCTATGAATTGCCTGATGG Rv-CGTTTTATGAATTCCAGTAGC	85

*Acesso da sequência presente no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do seqüenciamento da biblioteca de cDNA foram obtidas 3744 seqüências, com uma redundância de 48,33%, sendo utilizadas 753 seqüências não redundantes para a construção das lâminas de microarranjos de DNA. Cada um desses

clones amplificados apresentou uma banda, indicativo da presença de apenas um fragmento, com tamanho entre 0,4 a 1,6 Kb, correspondente ao inserto do DNA plasmidial (dados não mostrados).

No monitoramento do déficit hídrico no experimento de hidroponia os valores de taxa fotossintética e condutância estomática foram reduzidos gradativamente até o fim do experimento (100 minutos de estresse), porém apenas no tratamento T_0 (sem estresse) os valores apresentaram-se diferentes entre as cultivares Conquista e BR16. Nos demais tempos do tratamento não houve diferenças estatísticas significativas entre as cultivares (Figura 1A e B). A C_i e a temperatura foliar aumentaram proporcionalmente à severidade do estresse, porém na C_i os valores foram diferentes para cada cultivar, sendo maior na BR16 (Figura 1C) e os valores de temperatura foliar foram os mesmos nas duas cultivares estudadas (Figura 1D). No experimento para a construção da biblioteca de cDNA montado em vasos contendo areia, o perfil das respostas fisiológicas foi similar ao das plantas no sistema de hidroponia, apresentando valores de taxa fotossintética reduzidos em 24% para a cultivar Conquista e 40% para a cultivar BR16 e na condutância estomática os valores foram reduzidos em 65% e 50% para as cultivares Conquista e BR16, respectivamente, nos período de 15 dias após o início do estresse (T_1). Diferenças de fotossíntese não foram detectadas no segundo período de tratamento, ou seja, 30 dias após a aplicação do estresse (T_2) em ambas as cultivares, provavelmente porque as plantas já estavam entrando na fase de senescência. Porém, os valores de condutância estomática foram reduzidos em 79% na cultivar Conquista (STOLF et al., in press b). Os resultados com a cultivar BR16, em ambos os tratamentos sugerem um fechamento parcial dos estômatos, com entrada suficiente de CO_2 para a manutenção da fotossíntese e da concentração intercelular de CO_2 . Esses resultados são indicativos de que o tratamento aplicado foi efetivo em relação à severidade do estresse nos experimentos, sendo confiável a utilização dos tratamentos em ambos os experimentos para as análises moleculares.

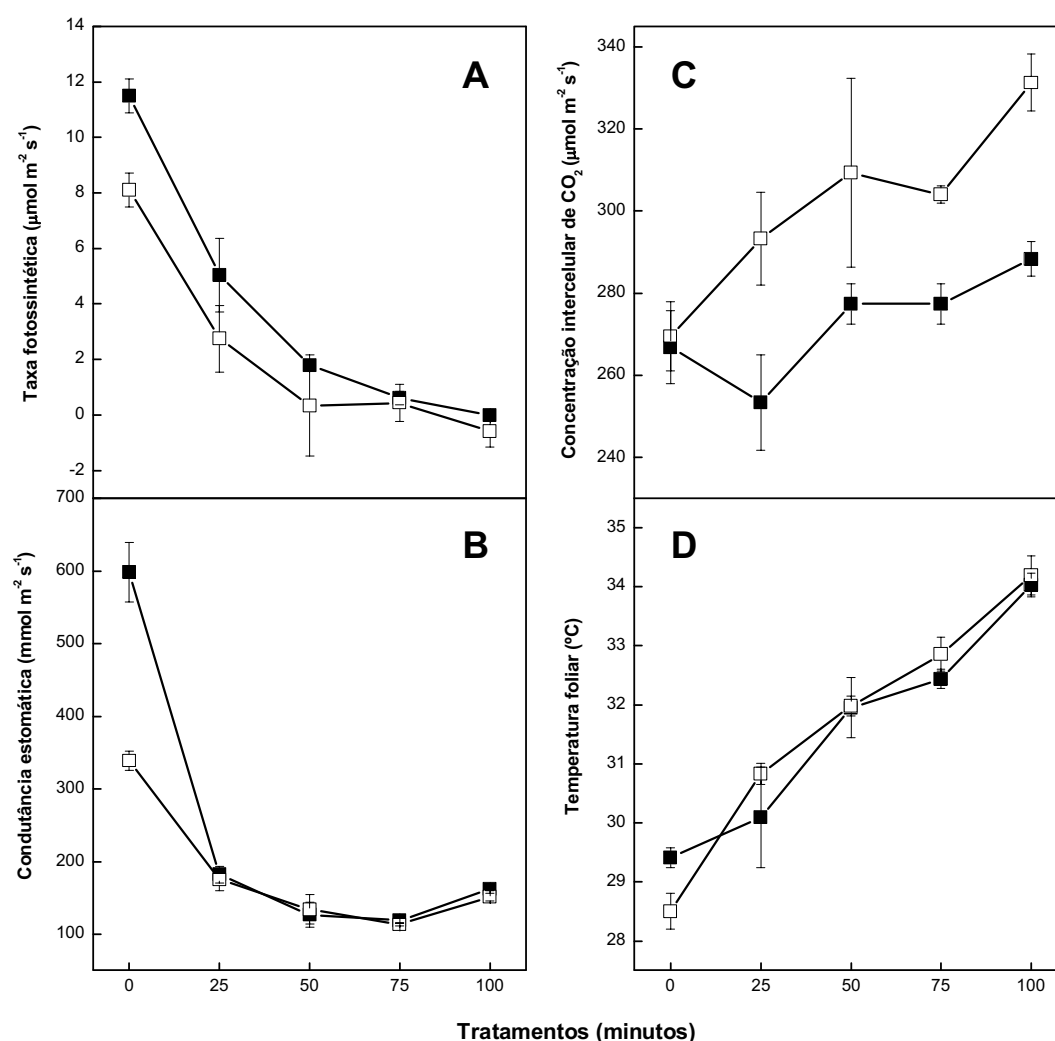


Figura 1. Parâmetros fisiológicos analisados nas duas cultivares de soja para o monitoramento do tratamento de seca aplicado (0, 25, 50, 75 e 100 minutos) em sistema de hidroponia. (A) taxa fotossintética, (B) condutância estomática, (C) concentração intercelular de CO_2 e (D) temperatura foliar. ■ Conquista e □ BR16. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Pela análise de microarranjos de cDNA foram identificados na cultivar Conquista 39 genes diferencialmente expressos (“up”-regulados) no primeiro período de tratamento (T_1) e 37 genes no segundo período de tratamento (T_2). Para a cultivar BR16 foram identificados 6 genes diferencialmente expressos (“up”-regulados) em T_1 e

63 genes em T_2 , sendo que dois genes nesse tratamento foram “down”-regulados. Os valores do “q-value” e da confiabilidade dos dados, que são indicadores significativos da expressão gênica, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros aplicados pela ferramenta SAM, durante a análise dos dados de microarranjos de cDNA, e número de genes diferencialmente expressos para as duas cultivares de soja, Conquista e BR16, em dois períodos de estresse (T_1 , 25 e 50 minutos de estresse e T_2 , 75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0 , sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Condição	Parâmetros de análise		Parâmetros computados				
	"Fold change"	"delta-Value"	FSN ("False Significant Number")	FDR ("False Discovery Rate")	"q-value" (%)	Confiabilidade dos dados	Genes diferencialmente expressos
Conquista T_1^*	2	0,87	0,83	2,13	2,13	97,87	39
Conquista T_2^{**}	2	0,66	0,84	2,27	2,27	97,73	37
BR16 T_1^*	2	0,19	0,83	13,88	9,25	90,75	6
BR16 T_2^{**}	1,5	0,54	1,00	1,58	1,58	98,42	63

*A hibridização foi feita utilizando-se cDNA do tempo zero (T_0 , sem estresse) marcado com “Cy5” e cDNA do primeiro período de tratamento - T_1 (25 e 50 minutos de estresse) marcado com “Cy3”.

**A hibridização foi feita utilizando-se cDNA do tempo zero (T_0 , sem estresse) marcado com “Cy5” e cDNA do segundo período de tratamento - T_2 (75 e 100 minutos de estresse) marcado com “Cy3”.

Os padrões de expressão dos transcritos de soja identificados estão representados nas Tabelas 3 a 6 e nas Figuras 2 a 4. Foram encontrados genes para nove categorias funcionais, entre elas energia, fatores de transcrição, metabolismo, resposta a estresses, síntese de proteínas, comunicação celular, ciclo celular, transporte celular, proteínas desconhecidas. Foram obtidas diferentes porcentagens de genes diferencialmente expressos dentro de cada categoria (Figura 2) e a inter-relação dos genes diferencialmente expressos nas duas cultivares e nos tratamentos aplicados (Figura 3).

Tabela 3. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no primeiro período de estresse – T₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₁			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão
Energia***			
BRSOGMSC1053A09.b	GO:0016787-Proteína alfa/beta hidrolase (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons	16,2
BRSOGMSC1049F01.b	GO:0008121-Complexo proteico Ubiquinol-cytochrome C reductase 7.8 kDa (<i>A. thaliana</i>)	Fosforilação oxidativa	9,31
BRSOGMSC1060E01.b	GO:0005507-Proteína Metalotioneína 1A (MT-1A) (MT-Q) (MT-2) (<i>A. thaliana</i>)	Via das pentoses-fosfato, resposta a alta intensidade luminosa e ao cobre	2,94
BRSOGMSC1048B06.b	GO:0000209-Bul1p (<i>Saccharomyces</i>)	Complexo de ligação da ubiquitina	1,55
Fator de transcrição***			
BRSOGMSC1059B12.b	GO:0003700-Proteína de ligação ao elemento de resposta ao etileno (EREB) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a citocinina	3,32
BRSOGMSC1051D01.b	GO:0016301-RCBF2/OsDREB1F (<i>O. sativa</i>)	Regulação da transcrição	2,34
BRSOGMSC1050E07.b	GO:0003700-bZIP (<i>A. thaliana</i>)	Regulação da transcrição	1,81
BRSOGMSC1053B07.b	GO:0003713-Swi6p (<i>Saccharomyces</i>)	Transcrição na fase G1/S do ciclo celular	1,5
BRSOGMSC1046C01.b	GO:0003700-MYB7 (<i>G. max</i>)	Resposta a todos os hormônios vegetais	1,59
BRSOGMSC1054E03.b	GO:0005525-Proteína Ras (ARA-5); pequena proteína de ligação ao GTP (<i>A. thaliana</i>)	Transporte mediado por vesículas do RE ao Golgi	1,95
BRSOGMSC1046E08.b	GO:0005622-Fator de despolimerização da actina 5 (ADF5) (<i>A. thaliana</i>)	Ligação à actina	2,87

Tabela 3. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no primeiro período de estresse – T₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₁			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Metabolismo***			
BRSOGMSC1045G06.b	GO:0004124-Cisteína sintase/O-acetilserina (tiol-liase)/O-acetilserina sulfidrilase (OAS1) (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de cisteína a partir de serina	2
BRSOGMSC1046H08.b	GO:0019825-Citocromo P450 (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a UV, biossíntese de flavonóides	1,67
BRSOGMSC1054C04.b	GO:0004462-Proteína da família lactoilglutathione liase (<i>A. Thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos	1,58
BRSOGMSC1060G03.b	GO:0003988-Acetil-CoA C-ateciltransferase 1 (<i>A. thaliana</i>)	Oxidação de ácidos graxos	1,5
BRSOGMSC1060A04.b	GO:0005507- Família de amina oxidase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de carotenóides	1,53
BRSOGMSC1050B06.b	GO:0008270-Família de proteínas desidrogenases de ligação ao zinco, oxidoreductase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade oxidorreductase	2,25
Resposta a estresses***			
BRSOGMSC1061G06.b	GO:0005575-Subunidade de uma proteína de ligação ao ATP (CipD), proteína ERD1 (<i>A. thaliana</i>)	Proteólise dependente de ATP	5,97
BRSOGMSC1049D04.b	GO:0005739-Subunidade da chaperonina 10kD (<i>A.thaliana</i>)	Dobramento de proteína	4,01
BRSOGMSC1048G06.b	GO:0003674-Proteína Late Embryogenesis Abundant (LEA14) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a alta intensidade luminosa e fermento	3,68
BRSOGMSC1060E03.b	GO:0009739-Família de proteínas reguladas pela giberelina (<i>A. thaliana</i>)	Responsivo a giberelina	1,55

Tabela 3. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no primeiro período de estresse – T₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₁			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Síntese de Proteínas***			
BRSOGMSC1045D06.b	GO:0003735-Proteína ribossômica 40S (RPS25A) (<i>G. max</i>)	Constituinte estrutural dos ribossomos	2,7
Comunicação celular***			
BRSOGMSC1047B05.b	GO:0005525-Proteína Ras (RAB7) (<i>G. max</i>)	Transporte intracelular de proteína	2,13
BRSOGMSC1047B12.b	GO:000166-Proteína de ligação a guanina extra grande/proteína G (XLG) (<i>A. thaliana</i>)	Transdução de sinal	1,51
Ciclo celular***			
BRSOGMSC1048D10.b	GO:0003917-Topoisomerase III (<i>A. thaliana</i>)	Desenrolamento do DNA durante a replicação	1,68
Desconhecida***			
BRSOGMSC1045F07.b	GO:0003674		7,47
BRSOGMSC1054B12.b	GO:0003674		4,68
BRSOGMSC1061C07.b	GO:0007616		3,9
BRSOGMSC1045E10.b	GO:0003674		3,46
BRSOGMSC1044D09.b	GO:0003674		3,07
BRSOGMSC1052C04.b	GO:0003674		2,6
BRSOGMSC1061F06.b		no hits found	2,46
BRSOGMSC1052G08.b	GO:0003674		1,93
BRSOGMSC1060H11.b		no hits found	1,58
BRSOGMSC1049D01.b	GO:0005575		1,57
BRSOGMSC1049B02.b	GO:0003674		1,51
BRSOGMSC1026B01.b		no hits found	1,51
BRSOGMSC1051E01.b	GO:0003674		1,58
BRSOGMSC1061B11.b	GO:0003674		1,99

*Código da sequência no banco de ESTs de soja (<http://bioinfo.cnpsa.embrapa.br>)

**Identificação pelo "Gene Ontology" e Similaridade pelo tBlastx (NCBI)

***Categoria Funcional pelo MIPs ("Monique Information for Protein Sequence")

Tabela 4. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₂			
ID Gene*	Sim ilaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Fator de transcrição***			
BRSGMSC1059A04.b	GO:0003700-dedo de zinco C2H2 (<i>G. max</i>)	Ligação a ácidos nucleicos e ao zinco	4,37
BRSGMSC1028H04.b	GO:0003700-Proteína de ligação ao elemento de resposta ao etileno (EREB) (<i>G. max</i>)	Regulação da transcrição	1,69
BRSGMSC1049C07.b	GO:0005488-Proteína de ligação ao elemento de resposta ao ABA (ABRE) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta ao estresse mediada por ABA	1,57
Metabolismo***			
BRSGMSC1048D09.b	GO:0004650-Exopoligalacturonase/galacturan 1,4-alpha-galacturonidase (PGA3)/pectinase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos, poligalacturonas	1,8
BRSGMSC1049E07.b	GO:0016706- Família de proteína oxigenase, oxidoreductase, 2OG-Fe(II) (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de flavonóides	3,58
BRSGMSC1061G09.b	GO:0004033-Família de proteínas aldo/ceto redutase (<i>A. thaliana</i>)	Atividades oxidoreductase e aldocetoreductase	3,39
BRSGMSC1061E01.b	GO:0004306-Etanolamina-fosfato citidililtransferase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	3,17
BRSGMSC1049A12.b	GO:0008375-Beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferase II (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de oligossacarídeos e peptídeos	2,89
BRSGMSC1050B06.b	GO:0008270-Família de proteína desidrogenase de ligação ao zinco e oxidoreductase (<i>A. thaliana</i>)	Ligação ao zinco, proteína induzida pela auxina	2,64

Tabela 4. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Metabolismo***			
BRSOGMSC1054A11.b	GO:0046872-Ligação a íons (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de íons	2,43
BRSOGMSC1051A07.b	GO:0016757-UDP-Família de proteínas glicosil transferase (<i>A. thaliana</i>)	Transferencia de grupos glicosil	1,85
BRSOGMSC1045A02.b	GO:0003674-UDP-D-glicuronate carboxi-liase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de produtos secundários	1,73
BRSOGMSC1054C04.b	GO:0004462-Família de proteína glicoxalase I, actolglutathione liase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos, poligalacturonas	1,52
BRSOGMSC1051D09.b	GO:0004518-Denosilhomocisteinase/S-adenosil-L-homocisteína hidrolase/AdoHciase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de compostos de um carbono, atividade adenosilhomocisteinase	1,96
BRSOGMSC1059G04.b	GO:0003978-UDP-glicose 4-epimerase/UDP-galactose 4-epimerase/Galactowaldenase (<i>A. thaliana</i>)	Metabolismo de galactose	1,86
BRSOGMSC1052A09.b	GO:0008150-HIDM mRNA for 2-Hidroxiisoflavanone desidratase/proteína relacionada a morte celular (<i>G. echinata</i>)	Biossíntese de isoflavona	1,55
Resposta a estresses***			
BRSOGMSC1051B06.b	GO:0005516-Chaperonin 10kD (CPN10) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta ao calor, dobramento de proteína	5,12
BRSOGMSC1048F01.b	GO:0016740-Peptidil-protil cis-trans isomerase/ciclophilina/rotamase (<i>A. thaliana</i>)	Dobramento de proteína	1,58

Tabela 4. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar Conquista no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

Conquista - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Desconhecida***			
BRSGMSC1047H04.b	GO:0003674		1,69
BRSGMSC1048G12.b		no hits found	1,61
BRSGMSC1049F11.b	GO:0003674		1,55
BRSGMSC1053H08.b	GO:0003674		1,51
BRSGMSC1050D09.b		no hits found	1,58
BRSGMSC1054H08.b	GO:0008150		1,84
BRSGMSC1048F05.b		no hits found	1,74

*Código da sequência no banco de ESTs de soja (<http://bioinfo.cnpsa.embrapa.br>)

**Identificação pelo "Gene Ontology" e Similaridade pelo tBlastx (NCBI)

***Categoria Funcional pelo MIPs ("Monique Information for Protein Sequence")

Tabela 5. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no primeiro período de estresse – T₁ (25 e 50 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

BR16 - T ₁			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Metabolismo***			
BRSOGMSC1059G04.b	GO:0003978-UDP-glicose 4-epimerase/UDP-galactose 4-epimerase/Galactowaldenase (A . <i>thaliana</i>)	Metabolismo de galactose	2,28
BRSOGMSC1048C10.b	GO:0000329-Permease, gamma-aminobutirate (GABA) (A. <i>thaliana</i>)	Envolvida na utilização de GABA como fonte de nitrogênio	2,19
BRSOGMSC1061G09.b	GO:0004033-Família de proteína aldo/ceto redutase (A . <i>thaliana</i>)	Atividades oxidoredutases e aldocetoredutases	1,87
BRSOGMSC1046H08.b	GO:0019825-Citocromo P450 (G. <i>max</i>)	Resposta a UV e biossíntese de flavonóides	1,61
Desconhecida***			
BRSOGMSC1047E08.b	GO:0003674		1,5
BRSOGMSC1044D02.b	GO:0003674		1,5

*Código da sequência no banco de ESTs de soja (<http://bioinfo.cnpsa.embrapa.br>)

**Identificação pelo "Gene Ontology" e Similaridade pelo tBlastx (NCBI)

***Categoria Funcional pelo MIPs ("Monique Information for Protein Sequence")

Tabela 6. Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

BR16 - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Energia***			
BRSOGMSC1049F01.b	GO:0008121-Complexo proteico ubiquinol-cytochrome C redutase 7.8 kDa (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons na mitocôndria (ubiquinol ao citocromo c)	1,5
Fatores de Transcrição***			
BRSOGMSC1054F10.b	GO:0016798-Proteína siríngolide induzida 19-1-5 (<i>G. max</i>)	Regulação da transcrição	3,51
BRSOGMSC1061C05.b	GO:0004842-Proteína siríngolide induzida 13-1-1 (<i>G. max</i>)	Regulação da transcrição	2,81
BRSOGMSC1054C09.b	GO:0030529-Proteína relacionada a ligação a ácidos nucleicos (<i>A. thaliana</i>)	Regulação da transcrição	1,76
BRSOGMSC1059B12.b	GO:0003700-Proteína de ligação ao elemento de resposta ao etileno (EREB) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a citocinina e etileno	1,69
BRSOGMSC1050E02.b	GO:0003700-Proteína NAC2 (<i>G. max</i>)	Desenvolvimento	1,52
BRSOGMSC1052C12.b	GO:0009733-Proteína de ligação a calmodulina (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a auxina	1,52
BRSOGMSC1051A04.b	GO:0003700-Proteína homeobox zipper de leucina 4 (HAT4) (<i>A. thaliana</i>)	Resposta a citocinina	1,9

Tabela 6. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

BR16 - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3")
Metabolismo***			
BRSGMSC1062F10.b	GO:0008150-Beta-fructosidase (BFRUCT4) / beta-fructofuranosidase (<i>A . thaliana</i>)	Catabolismo de sacarose usando beta-fructofuranosidase	2,74
BRSGMSC1052D06.b	GO:0016740-Antranilato N-hidroxicinamoil/família benzoiltransferase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade quinase	1,85
BRSGMSC1054C04.b	GO:0004462-Família de proteína lactoiliglutatona liase/glioxalase I (<i>A . thaliana</i>)	Metabolismo de carboidratos, atividade lactoiliglutathona liase	1,79
BRSGMSC1047H06.b	GO:0004553-Beta-fructosidase (BFRUCT3) / beta-fructofuranosidase (<i>A . thaliana</i>)	Catabolismo de sacarose usando beta-fructofuranosidase	1,73
BRSGMSC1050B06.b	GO:0003674-Família de proteína oxidoredutase, desidrogenase ligada ao zinco (<i>A . thaliana</i>)	Ligação ao íon zinco	1,58
BRSGMSC1059D03.b	GO:0016787-Família de proteína alfa-beta hidrolase (<i>A . thaliana</i>)	Metabolismo de compostos aromáticos e atividade hidrolase	1,59
BRSGMSC1051A07.b	GO:0016757-UDP-glicoronosil/família de proteína UDP-glicosil transferase (<i>A . thaliana</i>)	Transferência de grupos glicosil	1,56
BRSGMSC1061G09.b	GO:0004033-Família de proteína aldo/ceto redutase (<i>A . thaliana</i>)	Avidades oxidoredutase e aldocetoredutase	1,93
BRSGMSC1059E03.b	GO:0015996-Gravitropismo da parte aérea 2 (SGR2) (<i>G. max</i>)	Biogênese e organização de amiloplasto, detecção da gravidade	1,52
BRSGMSC1052A09.b	GO:0008150-Hidroxiisoflavanona desidratase (<i>A. thaliana</i>)	Biossíntese de isoflavona	1,56
BRSGMSC1044B12.b	GO:0004219-Família de proteína pirrolidona-carboxilato peptidase (<i>A . thaliana</i>)	Proteólise	1,83
BRSGMSC1060D03.b	GO:0005525-Proteína de ligação ao GTP regulada pelo desenvolvimento (DRG1) (<i>A. thaliana</i>)	Atividade GTPase	1,55

Tabela 6. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

BR16 - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão
Resposta a estresses***			
BRSOGMSC1059C07.b	GO:0008150-Família de proteína de um elicitador de fungo primário (<i>A . thaliana</i>)	Resposta a outros organismos	2,61
BRSOGMSC1049F03.b	GO:0009624-Proteína de resistência associada a multíditrogas 4 (<i>A . thaliana</i>)	Resposta a nematóide, a deficiência de água e movimento estomático	1,56
BRSOGMSC1048G06.b	GO:0003674-Proteína Late Embryogenesis Abundant (LEA 14) (<i>A . thaliana</i>)	Resposta a alta intensidade luminosa	1,95
BRSOGMSC1049E03.b	GO:0030145-Proteína de germinação (GLP4) (GLP5) (<i>A . thaliana</i>)	Resposta ao frio e a nutrientes	1,54
BRSOGMSC1060E03.b	GO:0009739-Snakin-1; família de proteína regulada por giberelina (<i>A . thaliana</i>)	Resposta a giberelina	1,7
Síntese de Proteína***			
BRSOGMSC1061E02.b	GO:0003735-Proteína ribossômica 40S (RPS21B) (<i>A . thaliana</i>)	Constituinte estrutural dos ribossomos, biogênese de ribossomo	2,32
BRSOGMSC1062B08.b	GO:0003735-Proteína ribossômica 60S (RPL37A) (<i>G . max</i>)	Constituinte estrutural dos ribossomos, biogênese de ribossomo	1,59
Comunicação celular***			
BRSOGMSC1049A05.b	GO:0016301-Proteína kinase serine/threonine (RKF2) (<i>A . thaliana</i>)	Sinalizador de resposta a atividade da proteína serina/treonina	2,53
BRSOGMSC1044F01.b	GO:0005515-Família de proteína rica em leucina (<i>A . thaliana</i>)	Sinal de transdução	1,52
BRSOGMSC1045F02.b	GO:0004712-Proteína kinase serine/threonine (RKF2) (<i>A . thaliana</i>)	Sinalizador de resposta a atividade da proteína serina/treonina	1,89

Tabela 6. (Continuação). Categorização dos genes diferencialmente expressos na cultivar BR16 no segundo período de estresse – T₂ (75 e 100 minutos de estresse) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

BR16 - T ₂			
ID Gene*	Similaridade**	Descrição	Expressão ("Cy5"/"Cy3)
Ciclo celular***			
BRSOGMSC1051E02.b	GO:0003697-Proteína de ligação a fita simples de DNA (<i>A. thaliana</i>)	Ligação a fita simples de DNA	1,71
BRSOGMSC1048D10.b	GO:0003917-DNA topoisomerase I (<i>A. thaliana</i>)	Atividade topoisomerase	1,64
Transporte celular***			
BRSOGMSC1062H02.b	GO:0015144-Família de proteína de transporte de açúcar 1 (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de açúcar e resposta a nematóide	2,3
BRSOGMSC1045F06.b	GO:0003674-Proteína de por nuclear 24kD (<i>A. thaliana</i>)	Desenvolvimento embrionário	1,9
BRSOGMSC1060D12.b	GO:0009670-Precursor do translocador fosfato/fosfoenolpiruvato (AraPPT) (<i>A. thaliana</i>)	piruvato através da membrana interna dos plastídeos	1,53
BRSOGMSC1044C04.b	GO:0003674-Proteína regulada pelo amadurecimento da planta (<i>A. thaliana</i>)	Atividade antiporter	1,97
BRSOGMSC1052G05.b	GO:0006118-Transporte de elétrons/ intermediário de trocas de tiol-disulfido (<i>A. thaliana</i>)	Transporte de elétrons, homeostase redox da célula	1,84
BRSOGMSC1047B10.b	GO:0015450-Proteína translocase (<i>A. thaliana</i>)	Atividade translocase, secreção de proteína	1,51
Down-Reguladas			
BRSOGMSC1029C04.b	GO: 0005515-Acetil coenzimaA carboxilase (<i>A. thaliana</i>)	Produção de energia celular	-3,13
BRSOGMSC1026F06.b		no hits found	-2,84

*Código da sequência no banco de ESTs de soja (<http://bioinfo.cnpsa.embrapa.br>)
**Identificação pelo "Gene Ontology" e Similaridade pelo tBlastx (NCBI)
***Categoria Funcional pelo MIPs ("Monique Information for Protein Sequence")

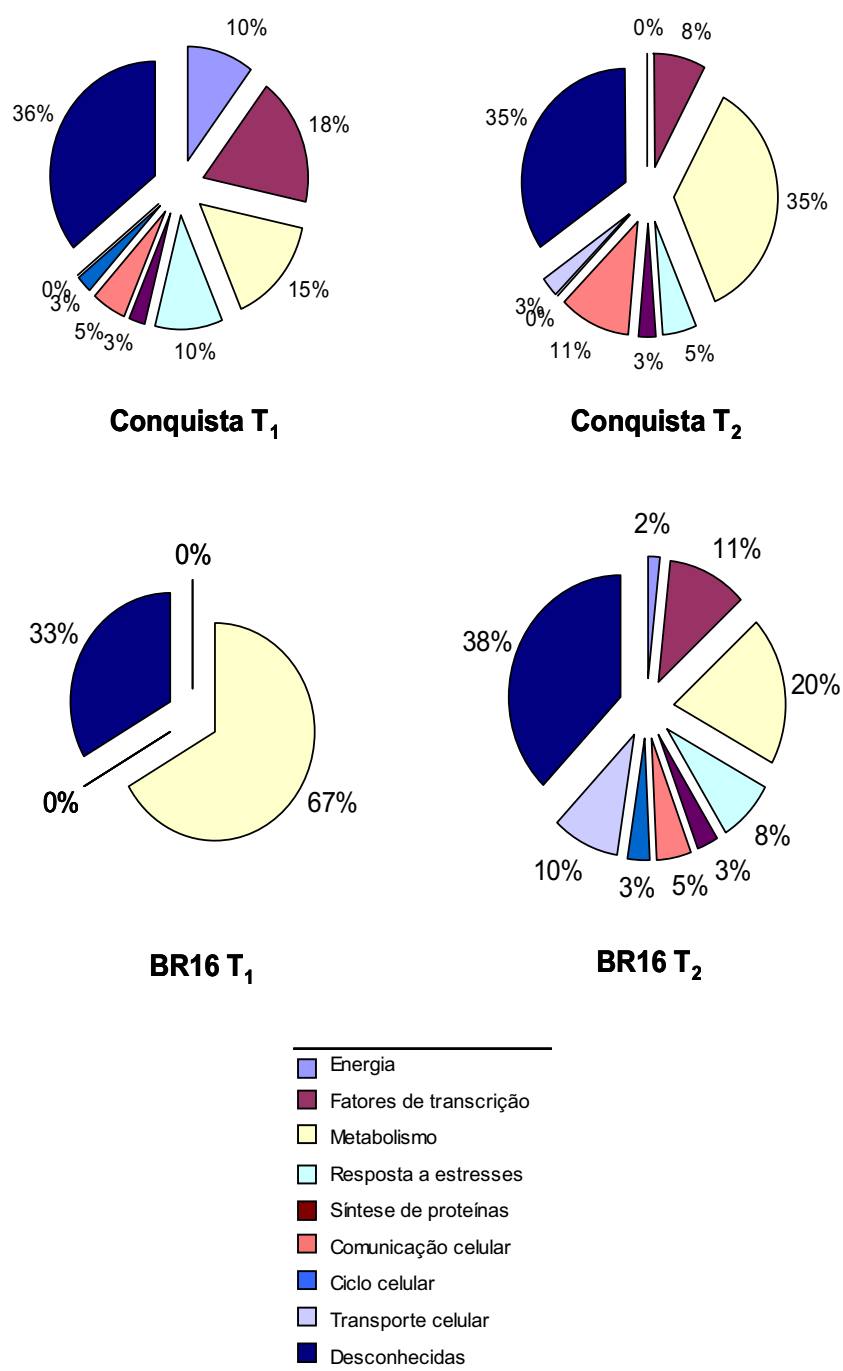


Figura 2. Taxas de expressão gênica por categorias funcionais em duas cultivares de soja, Conquista e BR16, sob diferentes condições de seca em sistema de hidroponia (T₁, 25 e 50 minutos de estresse; T₂, 75 e 100 minutos de estresse). O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

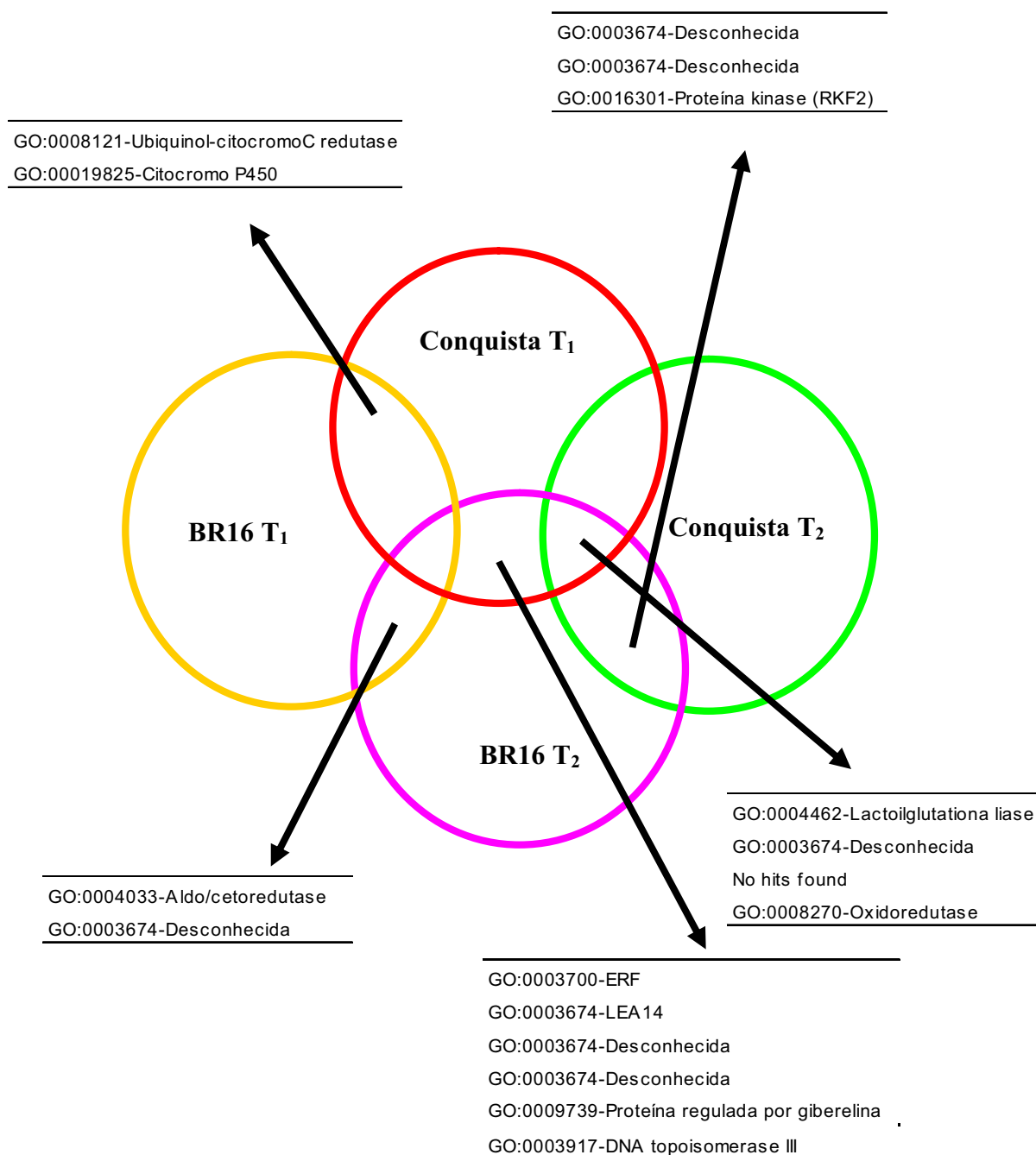


Figura 3. A inter-relação dos genes diferencialmente expressos nas cultivares de soja analisadas, Conquista e BR16, sob diferentes condições de seca em sistema de hidroponia (T₁, 25 e 50 minutos de estresse; T₂, 75 e 100 minutos de estresse). O tempo zero (T₀, sem estresse) foi usado como controle nas análises de microarranjos de cDNA.

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 *nac2*, *ereb*, *siringolide a* e *b*, *c2h2*, *myb*, *dreb1* 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 *erd1*, *erd6*, *lea14*, *cpn10*; e genes de resposta à sinalização do estresse, como proteínas kinase, 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 (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999; FRIEDMANN et al., 2007). Dados apresentados por SEKI et al. (2002) e VANDERAUWERA et al. (2007) também mostraram genes diferencialmente expressos relacionados diretamente com resposta a estresses abióticos, em *Arabidopsis thaliana*, entre eles o *erd1*, *lea14* e outros como *rd29a*, *kin1* e *cor15a*, indicando, por esses dados, uma sobreposição e compartilhamento de rotas metabólicas entre *Arabidopsis* e soja.

Genes desconhecidos ou sem categoria funcional foram os mais identificados nesse trabalho em ambas as cultivares, totalizando 29 genes, correspondendo a 20% dos transcritos diferencialmente expressos. Isso é uma indicação de que os transcritos dessa classe não foram descritos em outros organismos. No entanto, o número de transcritos funcionalmente desconhecidos é provavelmente maior porque muitos transcritos foram distribuídos por categorias baseada na similaridade de domínio com outras seqüências de proteínas deduzidas, enquanto a função atual deles não tem sido documentada. Além destes, genes que codificam fatores de transcrição e genes envolvidos no metabolismo foram os que tiveram também a maior representação nas duas cultivares de soja analisadas. Os fatores de transcrição identificados incluem aqueles que participam de vias biossintéticas e regulatórias, tais como *myb7*, *siringolide a* e *a*, *nac2*, *bzip*, *c2h2*, *ereb*, sendo que esse último foi identificado em ambas as cultivares. O que pode ser observado é que mais genes relacionados à resposta ao déficit hídrico foram identificados no primeiro período de tratamento na

cultivar Conquista e no segundo período de tratamento na BR16, simultaneamente. Isso poderia explicar, em partes, a diferença de tolerância e sensibilidade à seca dessas cultivares. A cultivar Conquista (tolerante) percebe mais rapidamente a situação limitante de água e, já no primeiro período de estresse hídrico desencadeou mecanismos de resposta imediatos, enquanto a cultivar sensível à seca (BR16), possui mecanismos mais tardios de resposta. Isso pode ser confirmado pelos dados de RT-qPCR do nível de RNAm quantificados em alguns genes avaliados, especialmente os fatores de transcrição *c2h2*, *nac2*, *siringolides a* e *b* e o gene *lea14*, envolvido diretamente na resposta ao estresse. Nesses resultados houve um maior valor de RQ, ou seja, um maior nível de RNAm detectado desses genes nos primeiros períodos de tratamento (T_{25} e T_{50}) na cultivar Conquista, sendo esses valores aumentados na cultivar BR16 no terceiro e quarto períodos de estresse (T_{75} e T_{100}), ou quando nos primeiros períodos, esses valores são inferiores aos observados na cultivar Conquista (Tabela 7).

Tabela 7. Análise comparativa da expressão de genes diferencialmente expressos por microarranjos de cDNA e RT-qPCR.

Gene	Conquista		BR16	
	Valores de Quantificação Relativa (RQ)			
	T ₁ (25 e 50 min)	T ₂ (75 e 100 min)	T ₁ (25 e 50 min)	T ₂ (75 e 100 min)
C2H2	12,61 e 2,36	4,33 e 1,68	6,67 e 9,26	3,26 e 12,16
NAC2	5,3 e 6,05	9,02 e 15,52	4,59 e 9	13,68 e 25,8
ERD1	1,21 e 1,6	1,34 e 0,88	2,82 e 1,77	1,51 e 1,25
LEA14	30,93 e 37,64	59,99 e 31,34	5,93 e 17,77	3,26 e 10,93
CPN10	2,46 e 3,48	1,44 e 1,99	2,84 e 4,91	6,13 e 1,68
SYR A	49,52 e 42,07	61,05 e 35,22	21,18 e 20,85	13,88 e 23,11
SYR B	74,57 e 27,8	24,68 e 26,42	29,14 e 15,11	5,94 e 13,35
P450	3,4 e 3,12	6,03 e 9,68	0,48 e 0,57	4,01 e 1,52

O gene *p450* que teve a expressão aumentada em ambas as cultivares no segundo período de tratamento. Esse gene tem uma função chave na biossíntese de vários compostos lipofílicos como ácidos graxos, esteróis, fenilpropanóis, fitoalexinas e giberelinas (NARUSAKA et al., 2004). Além disso, experimento feito com *Arabidopsis thaliana* relata que na região promotora desse gene há elementos cis atuantes de resposta a estresses abióticos, como para os genes *myb*, *myc*, *abre* e *nac* (SCHULER et al., 2006), numa via dependente de ABA. A análise de RT-qPCR mostrou altos níveis de expressão desse gene especialmente na cultivar tolerante (Conquista) (Figura 4). Infere-se, portanto, que o gene *p450* identificado nesse trabalho esteja envolvido na ativação do gene *Gmnac2*.

A família NAC é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas (OLSEN et al., 2005). Genes dessa família participam de vários processos biológicos incluindo o desenvolvimento e a resposta a estresses bióticos e abióticos (GUO et al., 2005). Foi identificada uma sequência do gene *nac2* (*Gmnac2*), na cultivar BR16, no segundo período de tratamento (T₂). A quantificação desse gene por RT-qPCR confirmou os dados observados pela análise de microarranjos, embora a cultivar Conquista também tenha apresentado níveis significativos de *Gmnac2* por RT-qPCR (Figura 4). Essa detecção dos níveis de RNAm do gene *Gmnac2* também na cultivar tolerante, assim como de outros genes validados, provavelmente seja devido a maior sensibilidade da técnica de RT-qPCR.

Estudo realizado com *A. thaliana* mostrou 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 entanto, o perfil de expressão do gene *Gmerd1* diferiu do gene *Gmnac2* nos resultados obtidos para as cultivares de soja, Conquista e BR16, analisadas por microarranjos e RT-qPCR (Figura 4). Porém, os níveis de expressão do gene *erd1* também não foram afetados em plantas transgênicas submetidas à seca que super-expressavam o gene *nac* em *A. thaliana*, quando comparados com as plantas controle (TRAN et al., 2007). Através do sistema regulatório independente de ABA, no qual o gene *erd1* faz parte, pesquisas, incluindo a análise de promotores, têm sido conduzidas

com o gene *erd1*, que é diferencialmente expresso em resposta à seca, salinidade e senescência induzida pela ausência de luz (NAKASHIMA et al., 1997). Foi demonstrado por SIMPSON et al. (2003), entretanto, que a expressão de *erd1* durante a desidratação é controlada pela atividade coordenada entre dois elementos “cis”-atuantes, o sítio de reconhecimento do fator de transcrição *myc* (CATGTG) e a sequência do sítio “rps1” do fator de transcrição *nac*, de 14 pb (CACTAAATTGTCAC). O gene *myc* não foi identificado pela análise de microarranjos de cDNA, provavelmente porque a redundância da biblioteca de cDNA não foi alta o suficiente para detectá-lo ou porque ele deve ser identificado em períodos mais precoces do estresse e como a aplicação do estresse ocorreu 30 dias após a emergências das plantas, para a construção dos arranjos, esse período deva ter sido tardio para a detecção desse fator de transcrição.

A indução do gene repórter *gus* dirigido pela região promotora do *erd1*, mostrou que na região promotora do *erd1* há a sequência de reconhecimento do *nac* (NACRS). Essa proteína NAC ativa a expressão do gene *erd1* na resposta a estresses. Devido à expressão do *nac* não induzir a transcrição do *erd1* no presente trabalho, sugere-se que o *nac* se ligue a essa região de reconhecimento, NACRS, e outros fatores de transcrição precisem se ligar ao sítio “rps1” e, juntos, controlarem a transcrição de *erd1* induzido por desidratação. Para um melhor entendimento da via de sinalização que leva a ativação de *erd1*, TRAN et al. (2007) isolaram fatores de transcrição dedos de zinco (*zfhd1*) contendo o domínio que pode se ligar ao sítio “rps1”. A super-expressão de ambos, o *nac2* e o *zfhd1*, ativou a expressão de *erd1* sob condições normais de crescimento (sem estresse), em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Esse fator de transcrição que contém domínios dedo de zinco também foi diferencialmente expresso na cultivar BR16 no segundo período de tratamento, assim como o gene *nac2* (Figura 4), indicando que esses fatores de transcrição que funcionam na expressão do gene estresse-induzido *erd1* devam ser ativadores transcrpcionais. Entretanto, a participação de um único fator de transcrição, por exemplo, o *zfhd1*, não é suficiente para produzir o aumento dos níveis de *erd1*. Essas observações sugerem que o acoplamento de mais fatores de transcrição é requerido. Dois trabalhos demonstram o envolvimento de ativadores transcrpcionais de genes estresse-induzidos, um deles o gene *rd22* que

durante a desidratação foi controlado via ação coordenada dos fatores *Atmyc2* e *Atmyb2* e a expressão de resposta ao ABA do gene *rd29a*, que requer a interação dos ativadores transcricionais *dreb* e *areb* (ABE et al., 2003; NARUZAKA et al., 2003).

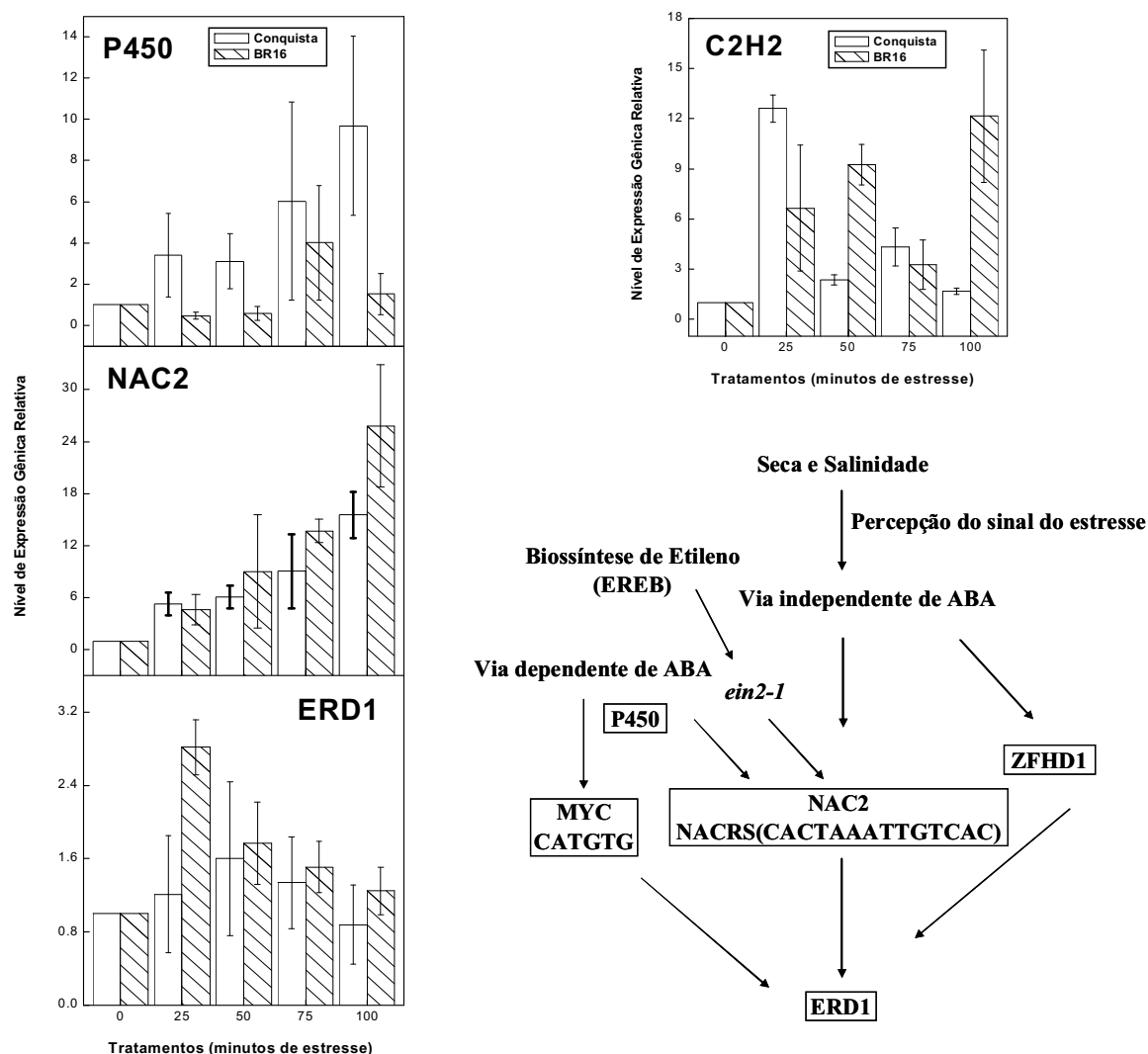


Figura 4. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *p450*, *nac2*, *erd1* e *c2h2* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0) foi usado como calibrador e o gene *Gm β -actina* foi utilizado como normalizador dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O esquema representa uma provável via metabólica que envolve os quatro genes estudados.

A expressão diferencial do gene *ereb* pode ser observada nas duas cultivares de soja analisadas (Figura 3), indicando que ambas as cultivares favorecem a ativação da rota de sinalização do etileno, embora isso ocorra em períodos diferentes do estresse. A maioria dos estudos da função dos genes de resposta ao etileno (*ereb*) mostram que a sinalização e a função dos receptores de etileno é importante na regulação do crescimento e da resposta ao estresse salino, observada em plantas de tabaco transgênicas que super-expressavam o receptor de etileno (NTHK1) (CAO et al., 2007). Isso pode ser confirmado através de tratamento feito com o precursor do etileno, o ACC, no qual a aplicação de ACC suprime completa ou parcialmente a epinastia (característica de resposta ao etileno), sugerindo que o etileno pode ser requerido para tolerância a estresses abióticos em plantas, como salinidade e seca (CAO et al., 2007). Um mutante sensível ao etileno, *ein2-1*, exibe sensibilidade ao sal, indicando que esse mutante promove a tolerância da planta à salinidade (ALONSO et al., 1999) (Figura 4). Essa proteína é essencial para a expressão induzida por sal do gene *Atnac2*, que promove a formação de raízes laterais (HE et al., 2005).

Os genes que codificam o fator de transcrição *siringolide*, embora estejam relacionados mais diretamente a estresse biótico, apresentaram os maiores valores de RQ para ambos as cultivares e tratamentos estudados (Figura 5). O *siringolide* é um elicitor que funciona no reconhecimento do patógeno, através da ligação a uma proteína citoplasmática que está presente em cultivares de soja resistente e suscetível (Rpg4/rpg4). No processo de reconhecimento e sinalização sinal há a ativação de vários processos bioquímicos como a ativação de outros genes de defesa, a biossíntese de fitoalexinas, a geração de espécies ativas de oxigênio (ROS) (SLAYMAKER & KEEN, 2003). Provavelmente, a participação do gene *siringolide a e b* no processo de tolerância à seca em plantas de soja estudadas nesse trabalho estejam relacionadas também com essa indução da expressão de genes, como proteínas MAP-kinases de resposta ao estresse, ROS e outros processos ainda desconhecidos, mas que são comuns para estresses bióticos e abióticos.

Genes que codificam componentes da síntese de proteínas foram também rapidamente induzidos, ou seja, no primeiro período de tratamento (T_1), na cultivar Conquista, mas a expressão desses genes não persistiu até o segundo período de tratamento, sugerindo um controle temporal em nível celular, garantindo a síntese de chaperoninas (*cpn10*) (Figura 5), observada pela quantificação dos níveis de RNAm por RT-qPCR, para a estabilização de proteínas sintetizadas precocemente, e a expressão em curto prazo de componentes envolvidos na síntese protéica, como os componentes estruturais dos ribossomos.

O gene *Gmlea14* apresentou expressão diferencial nas duas cultivares avaliadas por microarranjos (Figura 3), e após a validação por RT-qPCR foi observado maiores níveis de RNAm na cultivar Conquista em todos os tratamentos avaliados, embora a cultivar BR16 também apresente altos níveis de expressão do gene *Gmlea14*. Esse gene foi identificado em plantas de *Arabidopsis* contendo o gene *dreb1a*, submetidas ao frio (MARUYAMA et al., 2004), indicando que ele também pode ser ativado em condição de seca, uma vez que foi detectado no presente trabalho. Um estudo realizado por SEKI et al., (2002) com 7000 genes de *A. thaliana*, permitiu a identificação de 277 genes induzidos por seca, 53 induzidos por frio e 194 por salinidade, sendo que o gene *lea14* foi expresso mais de cinco vezes em todos estes estresses, indicando sua importância na tolerância a estresses abióticos (Figura 5).

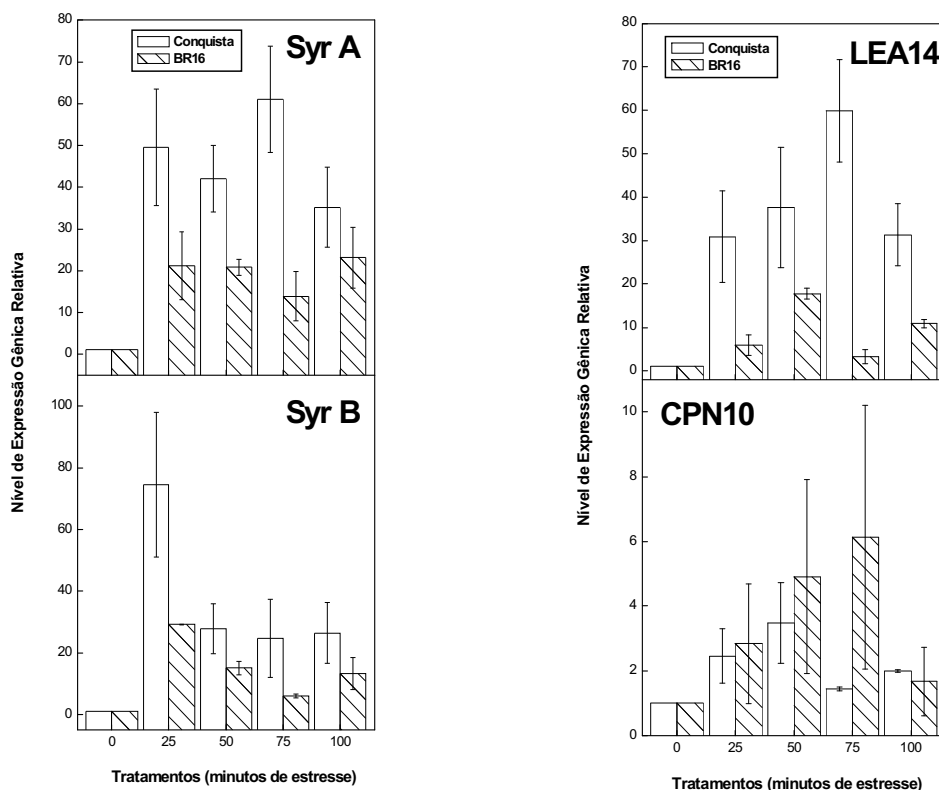


Figura 5. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *siringolide a e b*, *lea14* e *cpn10* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0) foi usado como calibrador e o gene *Gm β -actina* foi utilizado como normalizador dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v. 15, p. 63–78, 2003.
- ALONSO, J. M.; HIRAYAMA, T.; ROMAN, G.; NOURIZADEH, S.; ECKER, J. R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. **Science**, v. 284, p. 2148-2152, 1999.

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMANN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons (ed). New York, 1987.
- 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**, v. 28, p. 2000-2008, 2006.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513- 1523, 1979
- BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. **Nature Genetic**, v. 29, p. 365–371, 2001.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2331-2341, 2004.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.
- CAO, W. H.; LIU, J.; HE, X-J.; MU, R-L.; ZHOU, H-L.; CHEN, S-Y.; ZHANG, J-S. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. **Plant Physiology**, v. 143, p. 707-719, 2007.
- CHU, G.; NARASIMHAN, B.; TIBSHIRANI, R.; TUSHER, V. SAM “Significance Analysis of Microarrays”. Users guide and technical document, 2001.
- CLEVELAND, W. S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **Journal of American Statistic Association**, v. 74, p. 829-836, 1979.

- DERISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v. 278, p. 680-6, 1997.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genetic Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILIER, L. D.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genetic Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- 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**, v. 58, p. 593-614, 2007.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.
- 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**, v. 58, p. 253-265, 2007.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GUO, H. S.; XIE, Q.; FEI, J. F.; CHUA, N. H. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral roots development. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1376-1386, 2005.
- HALL, N. L. W.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KEIJER, J. The application of DNA microarray in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 271-280, 2000.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- 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**, v. 44, p. 903-916, 2005.

HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: Stewart, F.C. (Ed.), *Plant Physiology*. Academic Press, New York, pp. 97-134, 1963.

JONES, H. G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 119-130, 2007.

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**, v. 50, p. 439-451, 2007.

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**, v. 77, p. 226-233, 2003.

LEHANE, J. J.; STAPLE, W. J. Influence of soil texture, depth of soil moisture storage, and rainfall distribution on wheat yields in southwestern Saskatchewan. **Journal Soil Science**, v. 45, p. 207-219, 1965.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, v. 38, p. 982-993, 2004.

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**, v. 100, p.15718-15723, 2003.

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

MILLER, E. M.; NICCKOLOFF, J. A. Escherichia coli electrotransformation. **Methods in Molecular Biology**, 47ed. Humana Press, Totowa, NJ, 1995.

- NAKASHIMA, K.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 12, p. 851–861, 1997.
- NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **Plant Journal**, v. 34, p. 137–148, 2003.
- OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LO LEGGIO, L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Science**, v. 10, p. 79-87, 2005.
- OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUGITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 34, p. 868-887, 2003.
- OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, v. 7, p. 129–137, 2004.
- POROYKO, V.; SPOLLEN, W. G.; HEJLEK, L. G.; HERNANDEZ, A. G.; LENOBLE, M. E.; DAVIS, G.; NGUYEN, H. T.; SPRINGER, G. K.; SHARP, R. E.; BOHNERT, H. J. Comparing regional transcript profiles from maize primary roots under well-watered and low water potential conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 279-289, 2007.
- SCHULER, M. A.; DUAN, H.; BINJIN, M.; ALI, S. *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. **Phytochemistry Review**, v. 5, p. 205–237, 2006.
- SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.;

YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Responses to Drought Stress. In: Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence**, p. 11-28, 1999.

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

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

SIMPSON, S. D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, *acdpA* homologous Arabidopsis gene, function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant Journal**, v. 33, p. 259–270, 2003.

SLAYMAKER, D.; KEEN, N. T. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins. **Plant Science**, v. 166, p. 387-396, 2003.

SOUZA, J. A. M. Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* semia 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA. **Tese** (Doutorado), p 152, 2006.

STOLF, R.; LEMOS, E. G. M.; MARCELINO, F. C.; BENEVENTI, M. A.; YAMANAKA, N.; ABDELNOOR, R. V.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. (in press a) Comparison of endogenous control for real-time PCR analysis of gene expression in soybean. **Journal of Biotechnology**.

STOLF, R.; MEDRI, M. E.; LEMOS, N. G.; NEUMAIER, N.; BINNECK, E.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. C. N. De; Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L. (in press b) Physiological responses and differential gene-expression analysis in two contrasting soybean genotypes during drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**.

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**, v. 16, p. 2481–2498, 2004.

TRAN, L-S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S. D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, p. 46–63, 2007.

TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceeding Nature Academic Science**, v. 98, p. 5116-5121, 2001.

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**, v. 17, p. 113–122, 2006.

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. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0706668104, 104:15150-15155, 2007.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J. M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C. J.; SOUTHWICK, A. M.; WU, H. C.; KIM, C.; NGUYEN, M. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, v. 302, p. 842–846, 2003.

O gene *p450* que teve a expressão aumentada em ambas as cultivares no segundo período de tratamento. Esse gene tem uma função chave na biossíntese de vários compostos lipofílicos como ácidos graxos, esteróis, fenilpropanóis, fitoalexinas e giberelinas (NARUSAKA et al., 2004). Além disso, experimento feito com *Arabidopsis thaliana* relata que na região promotora desse gene há elementos cis atuantes de resposta a estresses abióticos, como para os genes *myb*, *myc*, *abre* e *nac* (SCHULER et al., 2006), numa via dependente de ABA. A análise de RT-qPCR mostrou altos níveis de expressão desse gene especialmente na cultivar tolerante (Conquista) (Figura 4). Infere-se, portanto, que o gene *p450* identificado nesse trabalho esteja envolvido na ativação do gene *Gmnac2*.

A família NAC é uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas (OLSEN et al., 2005). Genes dessa família participam de vários processos biológicos incluindo o desenvolvimento e a resposta a estresses bióticos e abióticos (GUO et al., 2005). Foi identificada uma sequência do gene *nac2* (*Gmnac2*), na cultivar BR16, no segundo período de tratamento (T₂). A quantificação desse gene por RT-qPCR confirmou os dados observados pela análise de microarranjos, embora a cultivar Conquista também tenha apresentado níveis significativos de *Gmnac2* por RT-qPCR (Figura 4). Essa detecção dos níveis de RNAm do gene *Gmnac2* também na cultivar tolerante, assim como de outros genes validados, provavelmente seja devido a maior sensibilidade da técnica de RT-qPCR.

Estudo realizado com *A. thaliana* mostrou 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 entanto, o perfil de expressão do gene *Gmerd1* diferiu do gene *Gmnac2* nos resultados obtidos para as cultivares de soja, Conquista e BR16, analisadas por microarranjos e RT-qPCR (Figura 4). Porém, os níveis de expressão do gene *erd1* também não foram afetados em plantas transgênicas submetidas à seca que super-expressavam o gene *nac* em *A. thaliana*, quando comparados com as plantas controle (TRAN et al., 2007). Através do sistema regulatório independente de ABA, no qual o

gene *erd1* faz parte, pesquisas, incluindo a análise de promotores, têm sido conduzidas com o gene *erd1*, que é diferencialmente expresso em resposta à seca, salinidade e senescência induzida pela ausência de luz (NAKASHIMA et al., 1997). Foi demonstrado por SIMPSON et al. (2003), entretanto, que a expressão de *erd1* durante a desidratação é controlada pela atividade coordenada entre dois elementos “cis”-atuantes, o sítio de reconhecimento do fator de transcrição *myc* (CATGTG) e a sequência do sítio “rps1” do fator de transcrição *nac*, de 14 pb (CACTAAATTGTCAC). O gene *myc* não foi identificado pela análise de microarranjos de cDNA, provavelmente porque a redundância da biblioteca de cDNA não foi alta o suficiente para detectá-lo ou porque ele deve ser identificado em períodos mais precoces do estresse e como a aplicação do estresse ocorreu 30 dias após a emergências das plantas, para a construção dos arranjos, esse período deva ter sido tardio para a detecção desse fator de transcrição.

A indução do gene repórter *gus* dirigido pela região promotora do *erd1*, mostrou que na região promotora do *erd1* há a sequência de reconhecimento do *nac* (NACRS). Essa proteína NAC ativa a expressão do gene *erd1* na resposta a estresses. Devido à expressão do *nac* não induzir a transcrição do *erd1* no presente trabalho, sugere-se que o *nac* se ligue a essa região de reconhecimento, NACRS, e outros fatores de transcrição precisem se ligar ao sítio “rps1” e, juntos, controlarem a transcrição de *erd1* induzido por desidratação. Para um melhor entendimento da via de sinalização que leva a ativação de *erd1*, TRAN et al. (2007) isolaram fatores de transcrição dedos de zinco (*zfhd1*) contendo o domínio que pode se ligar ao sítio “rps1”. A super-expressão de ambos, o *nac2* e o *zfhd1*, ativou a expressão de *erd1* sob condições normais de crescimento (sem estresse), em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Esse fator de transcrição que contém domínios dedo de zinco também foi diferencialmente expresso na cultivar BR16 no segundo período de tratamento, assim como o gene *nac2* (Figura 4), indicando que esses fatores de transcrição que funcionam na expressão do gene estresse-induzido *erd1* devam ser ativadores transcricionais. Entretanto, a participação de um único fator de transcrição, por exemplo, o *zfhd1*, não é suficiente para produzir o aumento dos níveis de *erd1*. Essas observações sugerem que o acoplamento de mais fatores de transcrição é requerido. Dois trabalhos demonstram o envolvimento de

ativadores transcricionais de genes estresse-induzidos, um deles o gene *rd22* que durante a desidratação foi controlado via ação coordenada dos fatores *Atmyc2* e *Atmyb2* e a expressão de resposta ao ABA do gene *rd29a*, que requer a interação dos ativadores transcricionais *dreb* e *areb* (ABE et al., 2003; NARUZAKA et al., 2003).

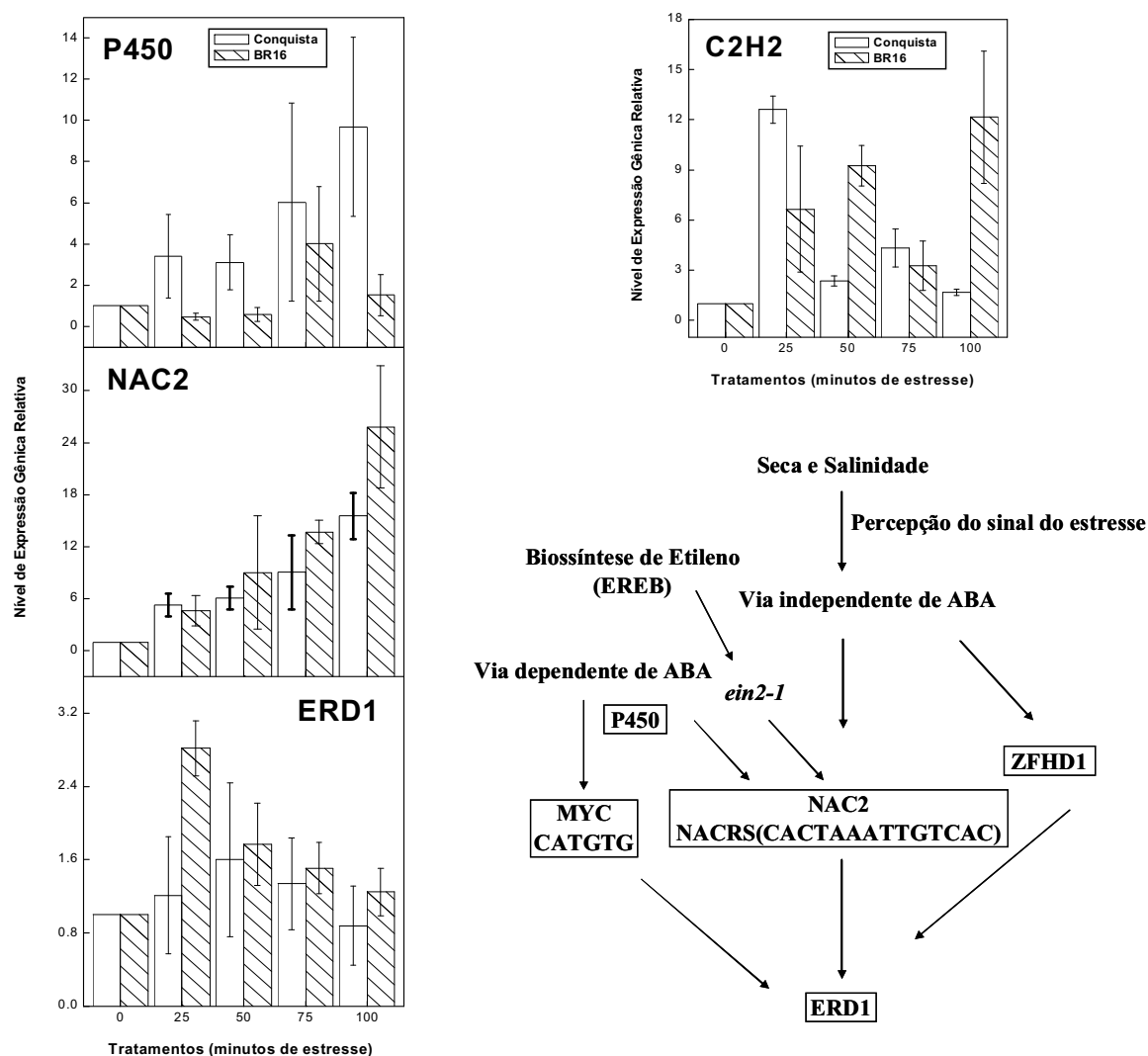


Figura 4. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *p450*, *nac2*, *erd1* e *c2h2* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0) foi usado como calibrador e o gene *Gm β -actina* foi utilizado como normalizador dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O esquema representa uma provável via metabólica que envolve os quatro genes estudados.

A expressão diferencial do gene *ereb* pode ser observada nas duas cultivares de soja analisadas (Figura 3), indicando que ambas as cultivares favorecem a ativação da rota de sinalização do etileno, embora isso ocorra em períodos diferentes do estresse. A maioria dos estudos da função dos genes de resposta ao etileno (*ereb*) mostram que a sinalização e a função dos receptores de etileno é importante na regulação do crescimento e da resposta ao estresse salino, observada em plantas de tabaco transgênicas que super-expressavam o receptor de etileno (NTHK1) (CAO et al., 2007). Isso pode ser confirmado através de tratamento feito com o precursor do etileno, o ACC, no qual a aplicação de ACC suprime completa ou parcialmente a epinastia (característica de resposta ao etileno), sugerindo que o etileno pode ser requerido para tolerância a estresses abióticos em plantas, como salinidade e seca (CAO et al., 2007). Um mutante sensível ao etileno, *ein2-1*, exibe sensibilidade ao sal, indicando que esse mutante promove a tolerância da planta à salinidade (ALONSO et al., 1999) (Figura 4). Essa proteína é essencial para a expressão induzida por sal do gene *Atnac2*, que promove a formação de raízes laterais (HE et al., 2005).

Os genes que codificam o fator de transcrição *siringolide*, embora estejam relacionados mais diretamente a estresse biótico, apresentaram os maiores valores de RQ para ambos as cultivares e tratamentos estudados (Figura 5). O *siringolide* é um elicitor que funciona no reconhecimento do patógeno, através da ligação a uma proteína citoplasmática que está presente em cultivares de soja resistente e suscetível (Rpg4/rpg4). No processo de reconhecimento e sinalização sinal há a ativação de vários processos bioquímicos como a ativação de outros genes de defesa, a biossíntese de fitoalexinas, a geração de espécies ativas de oxigênio (ROS) (SLAYMAKER & KEEN, 2003). Provavelmente, a participação do gene *siringolide a e b* no processo de tolerância à seca em plantas de soja estudadas nesse trabalho estejam relacionadas também com essa indução da expressão de genes, como proteínas MAP-kinases de resposta ao estresse, ROS e outros processos ainda desconhecidos, mas que são comuns para estresses bióticos e abióticos.

Genes que codificam componentes da síntese de proteínas foram também rapidamente induzidos, ou seja, no primeiro período de tratamento (T_1), na cultivar Conquista, mas a expressão desses genes não persistiu até o segundo período de tratamento, sugerindo um controle temporal em nível celular, garantindo a síntese de chaperoninas (*cpn10*) (Figura 5), observada pela quantificação dos níveis de RNAm por RT-qPCR, para a estabilização de proteínas sintetizadas precocemente, e a expressão em curto prazo de componentes envolvidos na síntese protéica, como os componentes estruturais dos ribossomos.

O gene *Gmlea14* apresentou expressão diferencial nas duas cultivares avaliadas por microarranjos (Figura 3), e após a validação por RT-qPCR foi observado maiores níveis de RNAm na cultivar Conquista em todos os tratamentos avaliados, embora a cultivar BR16 também apresente altos níveis de expressão do gene *Gmlea14*. Esse gene foi identificado em plantas de *Arabidopsis* contendo o gene *dreb1a*, submetidas ao frio (MARUYAMA et al., 2004), indicando que ele também pode ser ativado em condição de seca, uma vez que foi detectado no presente trabalho. Um estudo realizado por SEKI et al., (2002) com 7000 genes de *A. thaliana*, permitiu a identificação de 277 genes induzidos por seca, 53 induzidos por frio e 194 por salinidade, sendo que o gene *lea14* foi expresso mais de cinco vezes em todos estes estresses, indicando sua importância na tolerância a estresses abióticos (Figura 5).

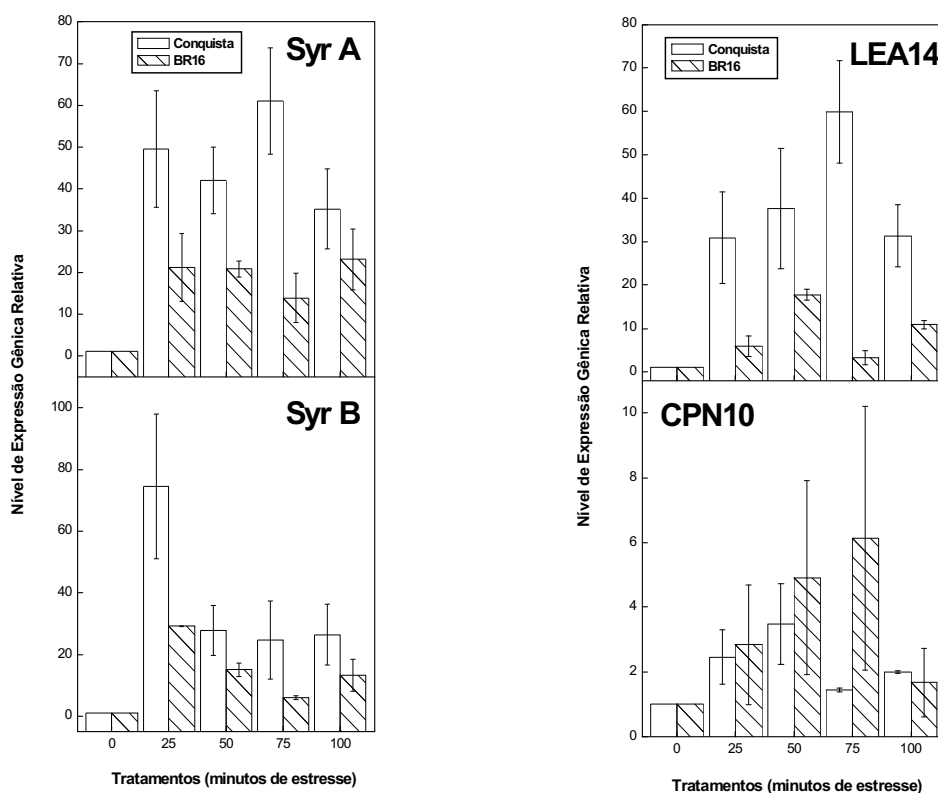


Figura 5. Níveis de expressão relativa dos genes diferencialmente expressos *siringolide a e b*, *lea14* e *cpn10* nas duas cultivares de soja, Conquista e BR16, submetidas aos tratamentos de estresse (0, 25, 50, 75, 100 minutos) em sistema de hidroponia. O tempo zero (T_0) foi usado como calibrador e o gene *Gm β -actina* foi utilizado como normalizador dos dados. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão e as diferenças estatísticas significativas observadas pelo teste de Tukey. Os pontos onde os traços não se sobrepõem indica diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v. 15, p. 63–78, 2003.
- ALONSO, J. M.; HIRAYAMA, T.; ROMAN, G.; NOURIZADEH, S.; ECKER, J. R. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. **Science**, v. 284, p. 2148-2152, 1999.

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMANN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons (ed). New York, 1987.
- 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**, v. 28, p. 2000-2008, 2006.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513- 1523, 1979
- BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. **Nature Genetic**, v. 29, p. 365–371, 2001.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2331-2341, 2004.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.
- CAO, W. H.; LIU, J.; HE, X-J.; MU, R-L.; ZHOU, H-L.; CHEN, S-Y.; ZHANG, J-S. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. **Plant Physiology**, v. 143, p. 707-719, 2007.
- CHU, G.; NARASIMHAN, B.; TIBSHIRANI, R.; TUSHER, V. SAM “Significance Analysis of Microarrays”. Users guide and technical document, 2001.
- CLEVELAND, W. S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **Journal of American Statistic Association**, v. 74, p. 829-836, 1979.

- DERISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v. 278, p. 680-6, 1997.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genetic Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILIER, L. D.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genetic Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- 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**, v. 58, p. 593-614, 2007.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.
- 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**, v. 58, p. 253-265, 2007.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GUO, H. S.; XIE, Q.; FEI, J. F.; CHUA, N. H. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral roots development. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1376-1386, 2005.
- HALL, N. L. W.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; KOK, E. J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KEIJER, J. The application of DNA microarray in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 271-280, 2000.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- 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**, v. 44, p. 903-916, 2005.

HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: Stewart, F.C. (Ed.), *Plant Physiology*. Academic Press, New York, pp. 97-134, 1963.

JONES, H. G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 119-130, 2007.

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**, v. 50, p. 439-451, 2007.

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**, v. 77, p. 226-233, 2003.

LEHANE, J. J.; STAPLE, W. J. Influence of soil texture, depth of soil moisture storage, and rainfall distribution on wheat yields in southwestern Saskatchewan. **Journal Soil Science**, v. 45, p. 207-219, 1965.

MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; KASUGA, M.; ITO, Y.; SEKI, M.; GODA, H.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, v. 38, p. 982-993, 2004.

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**, v. 100, p.15718-15723, 2003.

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

MILLER, E. M.; NICCKOLOFF, J. A. *Escherichia coli* electrotransformation. **Methods in Molecular Biology**, 47ed. Humana Press, Totowa, NJ, 1995.

- NAKASHIMA, K.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 12, p. 851–861, 1997.
- NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z. K.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **Plant Journal**, v. 34, p. 137–148, 2003.
- OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LO LEGGIO, L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Science**, v. 10, p. 79-87, 2005.
- OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUGITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 34, p. 868-887, 2003.
- OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, v. 7, p. 129–137, 2004.
- POROYKO, V.; SPOLLEN, W. G.; HEJLEK, L. G.; HERNANDEZ, A. G.; LENOBLE, M. E.; DAVIS, G.; NGUYEN, H. T.; SPRINGER, G. K.; SHARP, R. E.; BOHNERT, H. J. Comparing regional transcript profiles from maize primary roots under well-watered and low water potential conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 279-289, 2007.
- SCHULER, M. A.; DUAN, H.; BINJIN, M.; ALI, S. *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. **Phytochemistry Review**, v. 5, p. 205–237, 2006.
- SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.;

YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular Responses to Drought Stress. In: Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence**, p. 11-28, 1999.

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

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

SIMPSON, S. D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, *acdpA* homologous Arabidopsis gene, function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. **Plant Journal**, v. 33, p. 259–270, 2003.

SLAYMAKER, D.; KEEN, N. T. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins. **Plant Science**, v. 166, p. 387-396, 2003.

SOUZA, J. A. M. Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* semia 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA. **Tese** (Doutorado), p 152, 2006.

STOLF, R.; LEMOS, E. G. M.; MARCELINO, F. C.; BENEVENTI, M. A.; YAMANAKA, N.; ABDELNOOR, R. V.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L. (in press a) Comparison of endogenous control for real-time PCR analysis of gene expression in soybean. **Journal of Biotechnology**.

STOLF, R.; MEDRI, M. E.; LEMOS, N. G.; NEUMAIER, N.; BINNECK, E.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; OLIVEIRA, M. C. N. De; Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L. (in press b) Physiological responses and differential gene-expression analysis in two contrasting soybean genotypes during drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**.

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**, v. 16, p. 2481–2498, 2004.

TRAN, L-S. P.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S. D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, p. 46–63, 2007.

TUSHER, V.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing radiation. **Proceeding Nature Academic Science**, v. 98, p. 5116-5121, 2001.

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**, v. 17, p. 113–122, 2006.

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. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0706668104, 104:15150-15155, 2007.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J. M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C. J.; SOUTHWICK, A. M.; WU, H. C.; KIM, C.; NGUYEN, M. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, v. 302, p. 842–846, 2003.

CAPÍTULO 4 – ARTIGO III

COMPARAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM SOJA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL EM EXPERIMENTOS DE SECA

RESUMO - O estudo da expressão gênica em plantas inclui a quantificação precisa de RNAm sendo expresso em diferentes situações. A escolha do gene normalizador em experimentos de quantificação relativa por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é crucial para a fidelidade dos resultados. Os genes normalizadores devem apresentar um padrão de expressão constitutivo e não sofrerem alteração em função dos tratamentos conduzidos. Esse trabalho avaliou a quantificação dos níveis de expressão do gene *Gmdreb1a* em experimentos de indução de diferentes condições de déficit hídrico em soja, comparando quatro diferentes normalizadores. Foram utilizados três genes normalizadores comumente usados em experimentos de RQ (Relative Quantification) por RT-qPCR: *Gm β -actina*, *Gmgapdh*, *Gmrnar18S*, e ainda um gene de referência endógena utilizado em experimentos de quantificação absoluta em soja, o gene da *Gmlectina*. Para avaliar as alterações no padrão de expressão do gene alvo, os valores de Ct dos normalizadores e os resultados de quantificação após o emprego de cada normalizador foram comparados. Foi demonstrada a importância da escolha dos genes normalizadores no emprego da técnica altamente sensível em experimentos de quantificação da expressão gênica. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que na normalização do gene alvo com os genes *Gm β -actina* e *Gmgapdh* apresentaram uma menor variação dos valores de RQ, nos dois tecidos vegetais analisados, em relação aos outros genes, *Gmrnar18S* e *Gmlectina*. Nesse caso, o gene normalizador mais apropriado para trabalhos com soja e em experimentos de seca foi o *Gm β -actina*.

PALAVRAS-CHAVE: déficit hídrico, *Glycine max*, nível de RNAm e referência endógena

1 INTRODUÇÃO

O estudo da expressão gênica em plantas inclui a quantificação precisa de RNAm sendo expresso em diferentes situações, como estresses por temperatura, diferentes estádios de desenvolvimento, diferentes células ou tecidos. Poucas técnicas existem para estimar a quantidade de RNAm, como “Northern blotting” e RPA (“Ribonuclease Protection Assay”) (SUZUKI et al., 2000). Entretanto, nenhuma delas é tão precisa para quantificar moléculas de RNAm do que a técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (BUSTIN, 2000). No RT-qPCR a quantificação de RNAm é acompanhada pelos métodos de análises absoluta ou relativa (BUSTIN, 2000; BUSTIN, 2002). O método de quantificação relativa tem sido usado mais freqüentemente e, esse método fornece comparações precisas entre diferentes tratamentos em relação à expressão gênica. Entretanto, os resultados dependem de um normalizador para ajustar as variações nas amostras relacionadas à qualidade e quantidade do RNAm obtido (MCMAUGH & LYON, 2003; WILHELM et al., 2003).

Portanto, para a quantificação relativa é necessário o uso de um normalizador para ajustar as variações experimentais, causadas por diferenças na quantidade de RNAm extraído das amostras e usado nas reações. Geralmente, os normalizadores são genes constitutivos, ou seja, que tem expressão constante em todos os tecidos, estágios de desenvolvimento e também não são afetados por condições experimentais. Genes “housekeeping” têm sido a melhor referência para a normalização da análise de expressão gênica em RT-qPCR. Os genes que codificam a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (WALL & EDWARDS, 2002), a β -actina (KREUSER et al., 1999), a tubulina (BRUNER et al., 2004) ou a subunidade do RNA ribossômico (RNAr18S) têm sido os mais usados (BHATIA et al., 1994).

A expressão dos genes que codificam esses normalizadores é medida em cada amostra experimental junto com o gene alvo. Genes “housekeeping” têm sua expressão estável nas células, sendo expressos em níveis similares em diferentes tipos de células e usados para normalizar as comparações entre diferentes amostras. Entretanto, a expressão de genes “housekeeping” pode variar nos tecidos, em diferentes tipos de células ou devido a condições experimentais (BUSTIN, 2000).

O uso do gene *gapdh* como normalizador é recomendado com cautela, pois a expressão desse gene pode ser mais abundante em células em proliferação (BUSTIN, 2002; ZHU et al., 2001). O uso de *rnr18S* como referência não é sempre apropriado, pois como ele não tem a cauda poliA isso impede a síntese de cDNA com “primers” oligo-dT. Além disso, o gene *rnr18S*, sendo de origem ribossômica, nem sempre é inteiramente representativo da população de RNAm celular. Essa abundância relativa de RNAm raros poderia causar problemas na normalização de experimentos de RT-qPCR usando transcritos raros, como fatores de transcrição. Por outro lado, a expressão dos genes da *β -actina* ou da *tubulina* geralmente depende do estágio de desenvolvimento da planta (DIAZ-CAMINO et al., 2005; CZECHOWSKI et al., 2005).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar a expressão de um gene alvo (*Gmdreb1a*), normalizado com três normalizadores e um controle endógeno diferentes, em dois tecidos (folha e raiz) de plantas de soja, durante duas condições experimentais de seca (hidroponia e areia). Os resultados nos permitem desenvolver e avaliar condições ótimas de RT-qPCR para quantificar a expressão de genes da soja sob as diferentes condições experimentais de seca.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Experimento de Hidroponia

Uma cultivar de soja (*Glycine max*), BR16, sensível à seca, foi desenvolvida hidroponicamente com solução nutritiva (HEWITT, 1963) em um delineamento em

blocos ao acaso. As plantas foram crescidas por três semanas em casa de vegetação, em delineamento em blocos ao acaso com os tratamentos em arranjo fatorial: uma cultivar (BR16) e cinco períodos de avaliação (0, 25, 50, 75 e 100 minutos de estresse). O tratamento de seca foi aplicado, eliminando a solução nutritiva, quando as plantas estavam no estágio de desenvolvimento V₃. Foram feitos “bulks” para a síntese de cDNA, dos tratamentos T₂₅ e T₅₀ (raízes submetidas a 25 e 50 minutos de estresse) e T₇₅ e T₁₀₀ (raízes submetidas a 75 e 100 minutos de estresse), utilizando-se o tratamento T₀ (sem estresse) como controle.

2.2 Experimento em Vasos Contendo Areia

Esse experimento foi feito usando uma linhagem de soja geneticamente modificada - (P58), desenvolvida pela Embrapa Soja, em 2006, contendo a construção *rd29A*: DREB1A para tolerância à seca, e a cultivar original BR16 (não transgênica) como testemunha. Três condições de estresse foram aplicadas: um grupo controle a 15% de umidade gravimétrica (UG) (perto da capacidade de campo), um grupo estressado a 5% de UG (estresse moderado) e grupo estressado a 2,5% de UG (estresse severo), de acordo com LEHANE & STAPLE (1965). Cada grupo era composto de 12 plantas dos dois genótipos (seis de cada genótipo), semeadas em vasos de 10-L com areia, irrigado com solução nutritiva na casa de vegetação (dia 30°C±2°C; noite 22±2°C; UR 40%±5%), em delineamento em blocos ao acaso com os tratamentos em arranjo fatorial: uma cultivar (BR16) e três níveis de estresse (15%, 5% e 2,5% de umidade gravimétrica). Todas as plantas se desenvolveram por 45 dias em condições normais (15% de UG). O estresse hídrico foi iniciado por retenção da irrigação até a umidade da areia atingir 5% de UG, que correspondeu ao estágio de florescimento completo (R₂); e posteriormente atingir 2,5% de UG, que correspondeu ao estágio de enchimento de grãos (R₅); o grupo controle foi mantido em 15% de UG até o final do experimento. Os vasos foram pesados diariamente para a manutenção da umidade programada.

2.3 Desenho de Primers

Os “primers” específicos para os genes dos normalizadores e alvo foram desenhados a partir das regiões de ESTs da soja. As seqüências foram obtidas pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Os genes utilizados como normalizadores foram: *Gm β -actina* (Acesso No.: GMU60500), *Gmgapdh* (Acesso No.: DQ224371.1), *Gmrnar18S* (Acesso No.: X02623.1) e *Gmlectina* (Acesso No.: K00821). Como gene alvo foi usado o *Gmdreb1a* (Acesso No.: AF514908.1), um fator de transcrição de resposta à seca. Todos os “primers” foram desenhados pelo programa “Primer Express” versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), e foram ajustados a uma temperatura de anelamento de 62°C e o tamanho dos fragmentos variou na faixa de 75-155 pb (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência dos “primers” dos controles endógenos usados nas reações de RT-qPCR e tamanho esperado dos fragmentos gerados.

Nome dos primers	Seqüência dos primers	Tamanho esperado dos fragmentos (pb)
RTGm η -Actina -Fw	5' GAGCTATGAATTGCCTGATGG 3'	118
RTGm η -Actina -Rv	5' CGTITCATGAATTCCAGTAGC 3'	
RTGmGAPDH-Fw	5' GTGGAGACCCATTGGAGGAA 3'	118
RTGmGAPDH-Rv	5' TGGTTTGCTGCTGGTAATGGTA 3'	
RTGmRNAr18S-Fw	5' AAACGGCTACCACATCCAAG 3'	155
RTGmRNAr18S-Rv	5' CCTTCAATGGATCCATCGTTA 3'	
RTGmLectina-Fw	5' TCCACCCCCATCCACATTT 3'	92
RTGmLectina-Rv	5' GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA 3'	
RTGmDREB1A-Fw	5' CGACCAGGAGGGCAGTGAT 3'	75
RTGmDREB1A-Rv	5' GCTTTTCGGCGAATGGAAT 3'	

2.4 PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Primeiramente, dois passos importantes no desenho e avaliação do experimento de RT-qPCR para seleção dos genes a serem utilizados como normalizadores foram seguidos: (i) a verificação se a eficiência de amplificação de cada normalizador comparado com o gene alvo eram similares e (ii) a determinação se o padrão de expressão de tais genes não afetavam ou se são pouco afetados pelas condições experimentais. Para avaliar a expressão dos genes normalizadores nas folhas e raízes de soja, foram obtidas amostras de RNA total em três repetições biológicas. Para a síntese de cDNA foi utilizada a enzima transcriptase reversa “Superscript II First Strand Synthesis Kit” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para preparar o cDNA, 1 µg de RNA total foi usado e misturado com “primer” randômico (5 ng/µL).

As análises de RT-qPCR para os genes normalizadores e alvo nas amostras de cDNA foram conduzidas utilizando a metodologia “SYBR Green Master Mix” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em um termociclador 7300 RT-qPCR (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final de “primer” utilizada para os genes *Gmrnar18S*, *Gmgapdh*, *Gmdreb1a* foi 0,2 µM, e para os genes *Gmβ-actina* e *Gmlectina* foi de 0,15µM. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, em três repetições biológicas. A curva de eficiência de amplificação para cada gene foi determinada por comparação das diluições de cDNA (10 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), além da verificação da eficiência de amplificação dos “primers” na reação.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para cada tratamento é detectado o valor de Ct (“Cycle threshold”), tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do normalizador, para ajustar a reação. Obtém-se então o valor de ΔCt . O valor de ΔCt dos tratamentos é subtraído do valor do ΔCt da amostra controle (calibrador), tendo-se o valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

As condições das reações foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 2 min, 62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e os dados foram coletados na última fase (fase de extensão). Após a quantificação relativa, foi feita uma curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado. Temperaturas de dissociação do amplicon variando de 78°C a 85°C indicam amplificação de produto específico (alvo), abaixo dessa temperatura significa contaminação ou formação de dímeros de “primers” na reação. Os resultados foram analisados pelo programa “Sequence Detection” (Perkin Elmer, Massachusetts, CA, USA). Para calcular a eficiência da reação foi usada a fórmula: $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$. A curva de calibração foi estabelecida plotando-se graficamente os valores de Ct em função do log das diluições de cDNA. A curva de calibração, coeficiente de determinação (R^2) e eficiência obtidos estão representados na Figura 1.

Com os dados de quantificação relativa dos genes foram realizadas as análises exploratórias para verificar se as pressuposições de normalidade, aditividade do modelo, independência dos erros e homogeneidade de variâncias dos tratamentos estavam presentes no modelo. Posteriormente foram realizadas as análises pela ANOVA para todas as variáveis respostas. Os dois métodos foram analisados utilizando-se o programa SAS (“Statistical Analysis System”) versão 8.0 e as diferenças das médias dos níveis de estresse e dos genótipos comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coeficientes de determinação (R^2), obtido para todos os genes utilizados como normalizadores e o alvo (*Gmdreb1a*), foram acima do valor mínimo aceitável de 0,7 ou 70% (PFAFFL, 2001), com exceção do *Gmlectina* (Figura 1).

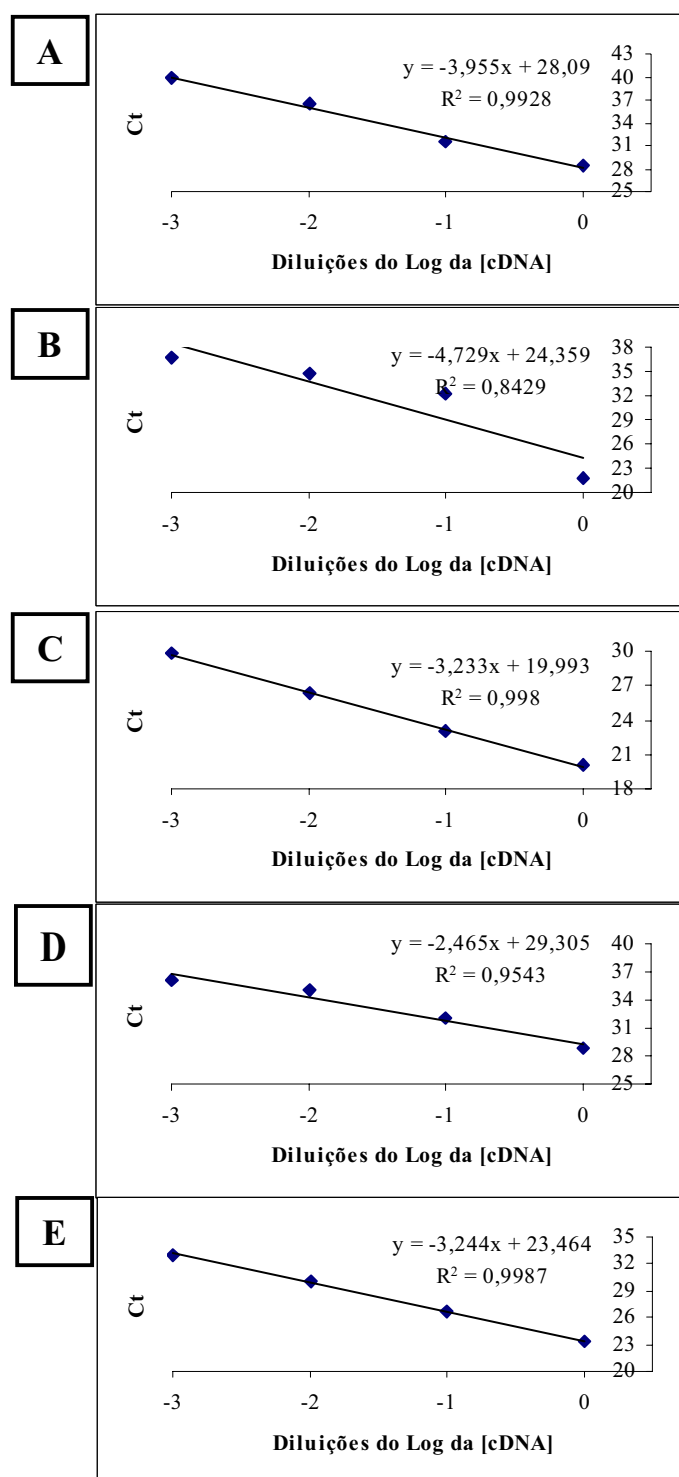


Figura 1. Curvas de calibração obtidas a partir dos controles endógenos. As diferenças entre os valores de Ct para cada controle endógeno foram plotadas como uma função do logaritmo das diluições de cDNA. A) *Gmrnar18S*-E=78,99%, B) *Gmgapdh*-E=72,72%, C) *Gmβ-actina*-E=96,15%, D) *Gmlectina*-E=45,5%, e E) *Gmdreb1a*-E=96,64%.

A diferença entre os valores de eficiência de cada gene normalizador comparado com o gene alvo ficaram em torno de 20%, sendo que para o gene *Gmlectina* esta variação foi a mais elevada, superior a 50%, considerando valores de eficiência (gene alvo + gene normalizador) igual a 1,927; 1,693; 1,755 e 1,421 para os genes *Gmβ-actina*, *Ggapdh*, *Gmrnar18S* e *Gmlectina*, respectivamente. Deste modo, para garantir que as diferenças nos valores de quantificação não seriam influenciados pelos valores das eficiências, as concentrações dos “primers” foram ajustadas e os valores de quantificação relativa foram obtidos usando os valores médios das eficiências entre o gene alvo e cada normalizador, sendo que a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi ajustada em cada caso.

A eficiência de amplificação dos “primers” para cada reação com os genes utilizados como normalizadores foi determinada a partir do “slope” (valor da inclinação da reta), obtido na amplificação por RT-qPCR, dentro de um experimento desenhado para comparar diferenças tecido-específica na expressão gênica. A determinação da eficiência e a sensibilidade do “primer” na reação mostraram que os valores de eficiência aceitáveis foram obtidos para os genes *Gmrnar18S*, *Gmgapdh* e *Gmβ-actina*.

Os valores de RQ para o gene *Gmdreb1a* em cada tratamento, a partir do emprego de cada normalizador, podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Valores da Quantificação Relativa (RQ) obtidos pela amplificação com o gene *GmDREB1A* (alvo) normalizados com os genes *Gmrnar18S*, *Gmgapdh*, *Gmβ-actina* e *Gmlectina* em folhas e raízes de soja submetidas a diferentes condições de estresse hídrico em vasos contendo areia e sistema de hidroponia.

Genes	Tratamentos							
	Valores da Quantificação Relativa (RQ)							
	Folha				Raiz			
	15%	5%	2,5%	média	T ₀	T ₁	T ₂	média
<i>Gmrnar18S</i>	1,00 ± 0,00	12,64 ± 1,05	11,4 ± 0,01	8,36 A	1,00 ± 0,00	4,40 ± 2,55	1,22 ± 1,61	2,20 AB
<i>Gmgapdh</i>	1,00 ± 0,00	8,84 ± 0,49	2,40 ± 0,28	4,08 A	1,00 ± 0,00	2,19 ± 1,89	0,87 ± 1,02	1,35 AB
<i>GmB-actina</i>	1,00 ± 0,00	13,60 ± 0,72	0,88 ± 0,14	5,16 A	1,00 ± 0,00	5,57 ± 3,29	1,61 ± 2,29	2,72 A
<i>Gmlectina</i>	1,00 ± 0,00	6,05 ± 0,68	10,5 ± 0,79	5,86 A	1,00 ± 0,00	1,53 ± 1,29	0,38 ± 0,15	0,97 B

*Os valores de desvio padrão nas linhas correspondem às diferenças observadas entre os tratamentos, em cada experimento e as letras maiúsculas nas colunas corresponde às diferenças observadas entre os genes, na análise da interação entre os genes e os níveis de estresse, pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os resultados de RQ quando utilizado o gene *Gmrnar18S* foram similares àqueles do gene *Gm β -actina* em folhas e raízes, exceto nas folhas a 2,5% de UG, que apresentou RQ dez vezes maior. Os valores de RQ do gene alvo normalizado com os genes *Gmgapdh* e *Gmlectina* mostraram elevada variação quando comparado com o RQ normalizado com os outros dois genes. Considerando que não há diferenças entre as amostras dentro de cada tecido, os genes *Gm β -actina* e *Gmrnar18S* foram considerados os melhores normalizadores para esse ensaio, pois os valores de RQ se mantiveram constantes nas diferentes repetições. Além disso, pelo teste de médias, foi possível identificar diferenças entre os tratamentos (níveis de estresse) em ambos os tecidos (folha e raiz) e também entre os genes apenas nas raízes (Tabela 2). Para o experimento feito em areia, com folhas, não houve diferenças entre os valores da média de RQ dos tratamentos aplicados para cada gene. Já em raízes, no sistema de hidroponia houve diferenças, mostrando que o valor de RQ normalizado com o gene *Gm β -actina* apresentou o maior valor na média dos tratamentos, comparado ao *Gmlectina*, com o menor valor de RQ.

A expressão do gene alvo (*Gmdreb1a*) foi normalizada com cada um dos normalizadores. Os resultados mostraram que dois genes normalizadores, *Gmrnar18S* e *Gm β -actina*, têm expressão similares nos dois diferentes tecidos de soja, em relação ao *Gmgapdh*, embora o valor de RQ normalizado com o gene *Gmrnar18S*, nas folhas estressadas (2,5% de UG), apresentou nível de expressão relativa do gene *Gmdreb1a* dez vezes maior, enquanto os genes *Gmgapdh* e *Gm β -actina* mostraram poucas diferenças entre os valores de RQ (Tabela 2). No entanto, nas raízes no sistema de hidroponia, o valor de RQ do gene alvo normalizado com os genes *Gmrnar18S* e *Gm β -actina* mostraram-se similares, enquanto a normalização feita com *Gmgapdh* e *Gmlectina* esses valores foram menores. Essa diferença pode ser devido à baixa eficiência de ambos os normalizadores (*Gmgapdh* e *Gmlectina*), mesmo que para o cálculo do RQ os valores da eficiência tenham sido ajustados. No caso do *Gmgapdh* o valor de E está próximo do valor mínimo recomendado, enquanto para o gene

Gmlectina o valor de eficiência não é o recomendado, estando bem abaixo do valor mínimo.

A diferença dos valores de RQ observada entre os experimentos (folha e raiz) pode estar relacionada com a forma como o experimento foi conduzido. No sistema de hidroponia, onde foi utilizado raízes, a percepção do estresse ocorre mais rápido, provavelmente. Assim, no momento da quantificação dos níveis de *Gmdreb1a*, os mecanismos para aumentar a tolerância à seca já podem ter sido desencadeados. Já no sistema com vasos contendo areia, a quantificação foi feita nas folhas, o que pode ter outros fatores influenciando no processo. Isso é confirmado pelos valores de RQ dentro dos tratamentos em cada gene, havendo um maior nível de expressão do gene alvo nas folhas. Além disso, os valores de RQ no primeiro período de estresse, nas folhas, na maioria das vezes foram sempre superiores, exceto para os genes *Gmrnar18S* e *Gmlectina*, que provavelmente superestimaram os valores de RQ devido a baixa eficiência de amplificação comparada com o gene alvo (*Gmdreb1a*).

Os valores de Ct (Figura 1) deram uma indicação direta da sensibilidade de detecção do cDNA, apresentando variações na reação, com valores de Ct variando de três a quatro ciclos dentro de cada amostra em duplicata. Isto pode representar uma combinação da variabilidade da técnica intrínseca do protocolo de RT-qPCR e da variabilidade biológica. A variabilidade da técnica pode ser atribuída aos fatores incontrolláveis como erros na estimativa do RNA total (erros do espectrofotômetro e impurezas na absorbância em 260 nm) e a variação da eficiência em diferentes reações de transcrição reversa.

De forma ideal, um gene para ser utilizado como normalizador em experimentos de quantificação da expressão gênica deveria ser expresso em um nível relativamente constante em diferentes tecidos e em todos os estádios de desenvolvimento, além de não ser afetado pela condição experimental (BUSTIN, 2000; ISKANDAR et al., 2004). Com base nos dados obtidos, os valores de RQ normalizados com os genes *Gm β -actina* e *Gmrnar18S* apresentaram-se mais constantes através dos diferentes tecidos e tratamentos da soja, apenas nas folhas, nos diferentes tratamentos de déficit hídrico, do que o normalizado com o gene *Gmrnar18S*. O gene *gapdh*, que codifica uma enzima da

via glicolítica presente na maioria dos tipos celulares (GIULIETTI et al., 2001) tem sido usado como normalizador em experimentos de RT-qPCR em amostras de animal e em humanos. Entretanto, alguns trabalhos desenvolvidos em sistemas animal e humano têm sugerido que esse gene tem limitações para o uso como normalizador, devido à variação na expressão em tecidos específicos e a variabilidade existente (BUSTIN, 2000; GIULIETTI et al., 2001).

Devido ao fato do RNAr representar a maioria do RNA total presente na célula, ele é considerado um normalizador eficiente, que vem sendo utilizado em muitos experimentos para quantificar os níveis de expressão em tecidos de animais, de humanos e de plantas (EDWARD, 2004). O uso de *mar* como gene normalizador para o RT-qPCR em arroz demonstrou a consistência de expressão comparada com os genes *gapdh*, *β -actina* e *β -tubulina* sob diferentes estádios de desenvolvimento da semente e tratamento com níveis de irradiação de UV (KIM et al., 2003). Entretanto, a alta abundância de RNAr requer maiores diluições do cDNA para permitir uma comparação direta com a amplificação de genes alvos. Esses passos de diluições requerem mais trabalho e impõem maiores níveis de erro, levando a inacurácia da análise de RT-qPCR (ISKANDAR et al., 2004). Conseqüentemente, é vantajoso ter outros genes normalizadores para uso como gene de referência e seria mais conveniente escolher um ensaio com normalizador menos sensível (SUZUKI et al., 2000).

O gene *Gmlectina* não apresentou resultados aceitáveis para ser usado como normalizador nos experimentos de indução de estresse hídrico em soja. Embora este gene seja muito utilizado em experimentos para quantificação absoluta do número de cópias de genes no genoma da soja, como por exemplo, a quantificação de transgenes, não foi observado o mesmo resultado na quantificação da variação dos níveis de RNAm. Esse gene se apresenta com uma cópia no genoma da soja e isso não significa ser um gene constitutivo (CZECHOWISK et al., 2005; BRUNER et al., 2004).

A partir dos resultados de expressão relativa do gene *Gmdreb1a* nos diferentes tecidos de soja testados em condição de seca, o gene mais apropriado para ser usado como normalizador, em condições de seca, é o gene da *Gm β -actina*, seguido do gene

Gmrrar18S e *Gmgapdh* e que apresentaram uma baixa variação dos valores de RQ do gene alvo (*Gmdreb1a*), nos dois tecidos de soja analisados.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATIA, P.; TAYLOR, W. R.; GREENBERG, A. H.; WRIGHT, J. A. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. **Annals of Biochemistry**, v. 216, p. 223–226, 1994.
- BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 14, 2004
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23–39, 2002.
- BUTTE A, DZAU, V. J.; GLUECK, S. B. Further defining housekeeping or "maintenance" genes. *Physiology Genomics*, v. 7, p. 95–96, 2001.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, p. 5–17, 2005.
- DIAZ-CAMINO, C.; CONDE, R.; OVSENEK, N.; VILLANUEVA, M. A. Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination of *Zea mays*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 557–565, 2005.
- EDWARD, K. J. Performing real-time PCR. In: Edwards, K.; Logan, J.; Saunders, N. (eds), *Real-time PCR: An essential guide*, Horizon Bioscience, Hethersett, Norwich, UK, p. 71–83, 2004.

- GIULIETTI, C.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine genes expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.
- HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: Stewart, F.C. (Ed.), **Plant Physiology**, p. 97-134, 1963
- ISKANDAR, H. M.; SIMPSON, R. S.; CASU, R. E.; BONNETT, G. D.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 325-337, 2004.
- KIM, B. R.; NAM, H. Y.; KIM, S. U.; KIM, S. I.; CHANG, Y. J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1869-1872, 2003.
- KREUZER, K. A.; LASS, U.; LANDT, O.; NITSCHKE, A.; LASER, J.; ELLEBROK, H.; PAULI, G.; HUHNE, D.; SCHMIDT, C. A. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. **Clinic Chemistry**, v. 45, p. 297-300, 1999.
- LEHANE, J. J.; STAPLE, W. J. Influence of soil texture, depth of soil moisture storage, and rainfall distribution on wheat yields in southwestern Saskatchewan. *Journal Soil Science*, v. 45, p. 207-219, 1965
- MCMAUGH, S. J.; LYON, B. R. Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. **Biotechniques**, v. 34, p. 982-986, 2003
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
- SUZUKI, T.; HIGGINS, P. J.; CRAWFORD, D. R. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, v. 29, p. 332-337, 2000.
- THELLIN, O.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNE, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 197-200, 1999.

WALL, S. J.; EDWARDS, D. R. Quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. **Annals of Biochemistry**, v. 300, p. 269–273, 2002.

WILHELM, J.; PINGOUD, A. E.; HAHN, M. SoFAR: software for fully automatic evaluation of real-time PCR data. **Biotechniques**, v. 34, p. 324–332, 2003

ZHU, G.; CHANG, Y.; ZUO, J.; DONG, X.; ZHANG, M.; HU, C.; FANG, F. Fudrine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. **Physiology**, v. 110, p. 555–559, 2001.

CAPÍTULO 5 – IMPLICAÇÕES

A seca é um importante fator limitante no sistema de produção agrícola em várias partes do mundo. As plantas apresentam diversas respostas biológicas de adaptação através dos mecanismos celulares. No entanto, é difícil de medir e de comparar essas mudanças em níveis fisiológicos e bioquímicos com precisão, mesmo sabendo que vários processos bioquímicos estão envolvidos na percepção e na transdução de sinais do estresse, que resultam em alterações no crescimento e no desenvolvimento, associadas com mudanças na expressão gênica.

O desenvolvimento de novas cultivares de plantas, mais tolerantes a períodos prolongados de déficit hídrico já está sendo produzido através da engenharia genética, como os eventos estudados nesse trabalho, contendo a construção *rd29a: dreb1a*. A análise de expressão gênica por microarranjos de DNA, estudada nesse trabalho, ajudou a identificar e a explicar um pouco da base dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas moleculares de eventos de soja geneticamente modificados que apresentaram uma maior tolerância à seca, além de duas cultivares de soja contrastantes à seca, Conquista e BR16, sob diferentes níveis de déficit hídrico.

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA, que permite avaliar alterações em larga escala na expressão gênica de uma forma global demonstra uma mudança significativa das técnicas tradicionais de abordagem de um único gene para acompanhar as alterações na expressão de milhares de genes de uma só vez. A análise de expressão gênica feita nesse trabalho foi útil no sentido de estudar várias respostas celulares existentes nas plantas de soja, uma vez que uma das aplicações potenciais dessa técnica consiste em identificar os mecanismos de tolerância à seca comparando mudanças na expressão gênica em fenótipos tolerantes e sensíveis. A identificação da expressão diferencial de genes pode servir como impressões digitais moleculares, o que pode facilitar o monitoramento de processos fisiológicos envolvidos na tolerância à seca, pois os padrões de expressão variam entre os estados fisiológicos de diferentes tecidos vegetais tais como folhas e raízes.

Ao executar a análise de expressão por microarranjos em plantas transgênicas pode-se avaliar o controle do gene *Atdreb1a* sobre a expressão de genes responsivos à seca. Considerando os resultados obtidos no capítulo dois, não foi observado um aumento significativo do gene *Gmdreb1a* nas plantas transformadas com a construção *rd29a: Atdreb1a* em condições de seca, embora a cultivar BR16 (não transformada) tenha apresentado altos níveis da expressão de *Gmdreb1a*. Esses dados indicam que o gene *Atdreb1a* não ativa o gene *Gmdreb1a*, porém infere-se que altos níveis de expressão do gene *Gmdreb1a* faz com que este também se ligue a região DRE, no promotor *rd29a* e contribua para a super-expressão do gene *Atdreb1a*, ativando toda a cascata de genes estresse-responsivos. Entre os eventos estudados (P58, P1378 e P1333) observa-se diferença significativa no nível de expressão do transgene *Atdreb1a*. A inserção da construção *rd29a: dreb1a* garante a indução de muitos genes envolvidos na resposta a seca, observados pela análise de microarranjos de DNA, incluindo fatores de transcrição, como NAC, bZIP, siringolide, proteína rica em prolina, aquaporina, enzimas envolvidas em diversos sistemas metabólicos e proteínas que ainda não apresentam função conhecida, mas que, provavelmente respondem diretamente ao déficit hídrico. Aspectos fisiológicos, incluindo a taxa fotossintética, condutância estomática e taxa transpiratória mantêm-se em níveis elevados nos eventos estudados quando comparados com plantas não transformadas (BR16), mostrando que alguns genes envolvidos com a resposta metabólica estão sendo ativados pelo gene *Atdreb1a*, acarretando assim em uma regulação nos processos fisiológicos.

Em plantas, a expressão gênica é regulada pela ligação de proteínas específicas, chamadas de fatores de transcrição, em que seqüências específicas localizadas na região promotora de genes responsivos ao estresse, que são co-expressas frequentemente e apresentam um padrão semelhante de regulação de seqüências que são responsáveis pela ligação desses fatores de transcrição. Fatores de transcrição como os identificados nesse trabalho, entre eles, NAC, EREB, MYC, C2H2, MYB são promissores candidatos ao uso, associado aos promotores estresse-responsivos, na geração de plantas geneticamente modificadas, assim como foi feito com as plantas contendo o gene *Atdreb1a*. Há um interesse considerável em identificar e utilizar fatores

de transcrição que são chaves na defesa de plantas, através de técnicas de engenharia genética, com o objetivo de obter cultivares com maior tolerância a estresses abióticos, maior resistência a patógenos e a agrotóxicos na agricultura.

Nas análises de microarranjos feitas nas cultivares de soja convencionais contrastantes em relação à seca foi possível identificar 145 genes diferencialmente expressos em duas cultivares de soja contrastante à seca. Nessa análise do perfil transcricional de soja, verificou-se que as duas cultivares apresentam respostas diferentes ao aumento do nível de expressão de genes de resposta à seca, que variou consideravelmente de acordo com a dinâmica do tratamento de seca (T_1 e T_2) e em relação às cultivares de soja estudadas, tolerante e sensível à seca. Em geral, quando as cultivares e os tratamentos foram comparados, o primeiro período de estresse revelou menor quantidade de genes diferencialmente expressos, sendo esse número significativamente aumentado no segundo período de tratamento, principalmente na cultivar BR16 (sensível à seca). Embora tenha havido a inter-relação de alguns genes nas duas cultivares, o tempo de percepção e, conseqüentemente, da ativação desses genes são regulados diferentemente. Dentre esses genes, alguns são candidatos a trabalhos mais detalhados em nível celular e funcional como, por exemplo, o gene *siringolide*, que apresentou o maior nível de expressão dos genes quantificados por RT-qPCR, os genes *nac2* e *erd1* que necessitam de análises mais detalhadas, especialmente na região promotora, possibilitando a construção de cassetes de super-expressão ou silenciamento gênico, para confirmar o envolvimento desses genes no mecanismo de tolerância à seca. Além disso, 20% dos genes identificados ainda não apresentam identificação em outros organismos, o que indica que a identificação dessas seqüências gênicas pode gerar dados promissores para o conhecimento de novos genes em soja e o desenvolvimento de processos que gerem patentes biotecnológicas, que possa contribuir para o enriquecimento, em nível de propriedade intelectual, da pesquisa científica brasileira.

A partir de um ponto de vista mais prático, os resultados sugerem que as informações de transcritos obtidas sob condições de seca devem ser analisadas em um curto tempo, isto é, nos primeiros 50 minutos de estresse, para serem usadas: i) no

melhor entendimento de como as plantas podem regular a expressão gênica em resposta à percepção do estresse desenvolvida e/ou ii) na identificação de genes candidatos para características relacionadas a estresses abióticos, com uma função adaptativa à seca. Para isso, uma análise mais detalhada dos dados disponíveis, a partir do perfil de transcritos existentes e de estudos do perfil de proteínas e metabólitos conduzidos sob vários regimes de desidratação, podem revelar informações adicionais a serem utilizadas para identificar genes candidatos e processos os quais a manipulação, através da engenharia genética, pode promover maior tolerância à seca.

A seleção de um gene normalizador apropriado é muito importante para a análise de RT-qPCR na obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis. O experimento realizado no capítulo quatro demonstra a utilidade dos genes normalizadores propostos (*Gmrrar18S*, *Gmgapdh*, *Gm β -actina* e *Gmlectina*) em estudos de expressão gênica em soja, sugerindo que o melhor normalizador para ser utilizado por RT-qPCR em experimentos de seca é o gene *Gm β -actina*.

Há algumas limitações da descoberta de genes utilizando a expressão por microarranjos. Uma delas é que esses arranjos, sendo baseados em RNA, produzem resultados que são altamente dependentes do estágio de desenvolvimento e do tecido da planta. É possível que um dos principais genes que sustenta a diferença entre cultivares tolerante e sensível é expresso em um momento ou em um tecido que não é testado no experimento, o que significa que o produto não será detectado. Outras diferenças genéticas entre cultivares tolerante e sensível podem ser devido a modificações pós-transcricionais as quais não seriam detectadas pela expressão diferencial, ou podem ser simplesmente devido a diferenças no tipo de planta ou na maturidade.

Tratamentos de seca mais severos tendem a medir a capacidade da planta em responder a uma mudança ambiental. Essa resposta é baseada na regulação de genes envolvidos na sensibilidade, sinalização e categorias de respostas imediatas. Entretanto, a seca imediata é diferente da mudança gradual do “status” hídrico no solo, e o resultado difere no comportamento. É então desconhecido que o grau de resposta ao estresse severo pode ser indicativo da capacidade da planta se adaptar a uma

mudança gradual no potencial de água do solo. Em contraste, uma redução lenta da umidade do solo deveria levar a uma mudança gradual na sensibilidade/sinalização que, vários dias após a seca, podem retornar a um nível de pré-estresse. Assim, os tratamentos de seca aplicados nesse trabalho estão apropriados aos resultados de aclimação decorrente do resultado de expressão diferencial dos transcritos que promovem a tolerância à seca por longo período.

A análise do perfil de transcritos são requisitos indispensáveis para entender o funcionamento de células, órgãos e da planta inteira. As funções dos genes analisados foram atribuídas por similaridade com proteínas cujas seqüências encontram-se em bancos de dados. Os dados apresentados refletem as taxas de expressão dos níveis relativos dos transcritos de genes individuais, não fornecendo indicações dos mecanismos de regulação ou da presença do produto final, a proteína expressa. Portanto, deve ser considerado que para se estudar a regulação gênica dos transcritos, verificações individuais e funcionais devem ser levadas em conta.

As informações geradas nesse trabalho, agora servem como base para trabalhos com função de elucidação de genes desconhecidos e/ou conhecidos e específicos, combinações de genes, como por exemplo, a montagem de cassetes de expressão e localização celular de proteínas em soja. A seqüência de informações associada às indicações da função biológica e dos padrões de expressão em cultivares de soja contrastante em relação à seca e nos eventos transformados com a construção rd29a: *dreb1a* direcionam a construção do conhecimento de características importantes como os mecanismos de tolerância à seca e o metabolismo secundário em plantas.