



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SELMA DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO
RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM RAÍZES DE
SOJA**

Londrina
2008

SELMA DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO
RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM RAÍZES DE
SOJA**

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

Orientador: Prof^o Dr^o Alexandre Lima
Nepomuceno

Co-orientadora: Francismar Corrêa Marcelino

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P436a Pereira, Selma dos Santos.
Análise da expressão de fatores de transcrição relacionados com tolerância à seca em raízes de soja / Selma dos Santos Pereira. – Londrina, 2008. ix, 107f. : il.

Orientador: Alexandre Lima Nepomuceno.
Co-orientador: Fracismar Corrêa Marcelino.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2008.
Bibliografia: f. 74-93.

1. Soja – Raízes – Déficit hídrico – Teses. 2. Genética Molecular – Teses. 3. Soja – Melhoramento – Teses. I.

SELMA DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO
RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM RAÍZES DE SOJA**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
EMBRAPA SOJA/UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves
IAPAR/UEL – Londrina – PR

Dr^a Francismar Corrêa Marcelino
EMBRAPA SOJA – Londrina – PR

Londrina, 26 de Julho de 2008.

*'Algo só é impossível até que alguém divida e
acabe provando o contrário" ~~fibet~~
Einstein*

Dedico:

**minha mãe Rita Pereira dos Santos,
minha maior incentivadora, com todo meu amor.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido a vida, a oportunidade de estudar e a força para vencer todos os obstáculos.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial a secretária do programa de pós-graduação, Sueli T. Miranda, pela atenção e dedicação, e à coordenação do curso, a Dra Ilce M. Colus e Ana Lúcia Dias.

A Embrapa Soja, pela oportunidade de estágio e bolsa de estudos, e ao JIRCAS, (*Japan International Research Center for Agricultural*) pela bolsa concedida.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno, por ter me orientado durante o mestrado, por ter compreendido minhas dificuldades e ter me apoiado e ajudado em todos os momentos.

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino, por ter-me co-orientado nesse trabalho, tendo paciência em responder minhas dúvidas, das mais simples às mais difíceis, por ter sido também amiga, além de orientadora.

Ao Dr. Luiz Gozaga, membro da banca examinadora pelas críticas e sugestões.

Ao Dr. Rodrigo Matheus Pereira e o Dr. Eliseu Bineck, pela ajuda na área de bioinformática e à pesquisadora Maria C. Neves pela ajuda na estatística.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja, César Silveira e Nilson Vieira, pelo companheirismo, ensinamentos e incentivos.

À Silvana R. R. Marin, pela amizade, ajuda, dedicação e pelo exemplo de excelente pessoa e profissional.

À querida Vera Lúcia Pierotti, nossa Verinha, por seu carinho e apoio maternal.

À Dra. Renata Stolf, por ter ajudado em todas as fases desse trabalho, por ter dado ótimas sugestões, dicas, orientações e, por ter sempre me incentivado, ajudado e sido amiga em todas as horas.

À querida amiga Dra. Renata Fuganti, por ter sido mais que amiga, ajudando em todos os momentos, tirando minhas dúvidas, ouvindo meus desabafos, dando conselhos preciosos, enfim, por ser a pessoa maravilhosa que é. Também aos seus pais, Luiz e Gisleni, que me adotaram como filha.

À querida amiga Amanda A. P. Rolla pelos momentos que passamos de madrugada realizando trabalhos. Por ter me ouvido, dado forças nos momentos mais difíceis e por deixar claro que sempre posso contar com sua amizade.

Aos amigos de laboratório na Embrapa Soja João Vitor, André Passianoto, André Paulo, Amanda Rusiska, Magda Beneventi, Lizandra Catelli, Adriana Polizel, Paula Camargo, Maria Cecília Soldeira, Daiana Alves, Cibelle Engels, Jairo, Valéria Lopes, Gustavo Macorini, Antonio Augusto Lazarini, JaKeline Delamuta, Marcelo Iwata, Salvador Lima, Maria Thereza Bazzo, Thales Barreto e Leidy Amaral, pelos conselhos, ajuda, carinho e amizade demonstrados durante o convívio.

Aos amigos que não estão mais no laboratório, mas que estão sempre no meu coração: Luana Gonçalves (Florzinha), Lívia Nogueira, Daiane Campana e, em especial à querida Àguida Morales, que sempre foi amiga para todas as horas, incentivando e estando sempre à disposição, em todos os momentos.

À amiga e quase mãe, Danielle Cristina Gregorio da Silva, pelo seu carinho, afeto, ótimos conselhos, por ter me dado a primeira oportunidade, sem a qual, não teria chegado aqui, e por ser um grande exemplo de força, determinação e profissionalismo.

Aos colegas do Mestrado, em especial às amigas Ilara Budzinski e Marcela Tsuboy, pela ajuda, carinho, incentivo demonstrados durante o convívio e, também ao Éverson Odery, que juntamente comigo, formávamos a "turma esquecida".

Aos meus amigos de longa data, Regiane C. Silva, José Perez, Roseli, Maria Matida, Ana Lúcia Cabral, Luciana Socorro, Fernando Barreto, Dellyana Boberg, Mary Christine, Melissa de Angelo, Gislaine Munhoz, Iara Siqueira, que foram mais que amigos, e sempre acreditaram em mim.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Rita, que sempre me incentivou a estudar e me ajudou a vencer todas as dificuldades, e por ter me dado os melhores exemplos de caráter respeito, honestidade e por ter sido, sem dúvidas, a melhor mãe do mundo.

Aos meus irmãos e irmãs, em especial a Elza Pereira, Mauro J. Pereira e Ismael J. Pereira e aos seus respectivos esposos e esposas, pois, sem esse apoio, não teria realizado o estágio na Embrapa. Ainda às minhas irmãs Maria Cleide Pereira, Fátima S. Pereira e ao seu esposo, que me deram todo apoio e auxílio, ao meu sobrinho Emannuel J P. Carvalho pelo seu carinho, e ao meu querido pai Manoel, *in memoriam*. Meu amor e eterno agradecimento.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e me ajudaram a vencer mais esta etapa.

MUITO OBRIGADA!!!

PEREIRA, Selma dos Santos. **Análise da expressão de fatores de transcrição relacionados com tolerância à seca em raízes de soja.** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Eventos de seca têm aumentado nas últimas décadas, provavelmente associados às mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta. Atualmente as perdas provocadas pelo déficit hídrico constituem um problema grave na produção de grãos. Centenas de genes estão envolvidos na resposta a estresses abióticos e a análise da expressão destes genes demonstra a existência de diversos sistemas regulatórios estresses-responsivos. Os fatores de transcrição interagindo nas complexas rotas metabólicas de resposta aos estresses ambientais induzem alterações nos níveis de expressão de alguns genes, que, em muitos casos, proporcionam o aumento da tolerância a esses estresses. Em trabalho anterior utilizando a técnica de microarranjos de cDNA, foram encontrados 145 genes diferencialmente expressos em condição de seca, os quais foram identificados e categorizados de acordo com suas funções biológicas. Dentre as categorias, os fatores de transcrição, normalmente envolvidos na regulação das respostas gênicas, foram escolhidos para terem seus níveis de expressão quantificados pela técnica de PCR em Tempo Real. Foram selecionados os fatores de transcrição *bZIP50*, *C2H2*, *MYBJ7* e *NAC2*, que quando tem suas seqüências de aminoácidos alinhadas com as de outros vegetais, utilizando o programa Clustalx, apresentaram os domínios e/ou regiões conservadas que os caracterizam como pertencentes às famílias bZIP, C2H2, MYB e NAC respectivamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar a expressão gênica dos fatores de transcrição, *bZIP50*, *C2H2*, *MYBJ7* e *NAC2*, identificados como diferencialmente expressos no estudo com microarranjos de cDNA, através da técnica de PCR em tempo real. Deste modo, um experimento foi realizado em hidroponia com as cultivares de soja MG/BR46 (cultivar Conquista) -tolerante a períodos de seca, e BR16 - padrão de sensibilidade à seca. Quando atingiram o estágio V₃ de desenvolvimento, as plantas foram submetidas a estresses de déficit hídrico, sendo aplicados os tratamentos: tempo 0 (controle), 25 mim, 50 mim, 75 mim e 100 min. Para a extração de RNA total e síntese de cDNA foram coletadas raízes de cada tratamento. Os resultados da quantificação relativa mostraram que todos os fatores de transcrição avaliados tiveram sua expressão aumentada quando amostras de plantas submetidas ao estresse hídrico foram comparadas com plantas utilizadas como controle. Estes dados confirmam que tais fatores de transcrição participam de rotas metabólicas importantes de resposta à seca, como já relatado em trabalhos anteriores e na literatura. Deste modo, passos futuros para este estudo serão a construção de cassetes de superexpressão ou silenciamento visando a obtenção de cultivos de soja mais tolerantes à seca.

Palavras-chave: Soja. Déficit hídrico. Fatores de transcrição. Expressão gênica. PCR em tempo real.

PEREIRA, Selma dos Santos. **Análise da expressão de fatores de transcrição relacionados com tolerância à seca em raízes de soja.** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Drought events have been increasing in the last decades, probably associated with the climatic changes due to global heating. Actually, losses associated with water deficit are a serious problem in grains production. Hundreds of genes are evolved with response to abiotic stresses and the analysis of these genes expression shows the existence of diverse regulatory system stress-responsive. Transcription factors interacting in complex metabolic pathways of response to ambient stresses induct alterations on level expression of some genes, which in many cases; promote higher levels of tolerance to these stresses. In a previous work using cDNA microarray technique, 145 genes were identified as differentially expressed, drought conditions, which were categorized following its biological functions. Inside the categories, the transcription factors, normally evolved in the genetic response, were chosen to have their gene expression level quantified using by Real time PCR. Were chosen *bZIP50*, *C2H2*, *MYBJ7* and *NAC2* which after had their amino acid sequence aligned with other plants, using Clustalx software presented domain and/or conserved regions that characterized them as belonging to families bZIP50, C2H2, MYBJ7 and NAC respectively. Thus the objective of this work quantify the gene expression of transcription factors *bZIP50*, *C2H2*, *MYBJ7* and *NAC2*, identified as differentially expressed in the cDNA microarray study, thought Real time PCR. So, an experiment was conducted in hydroponic conditions, with two soybean cultivars, MG/BR46 (Cultivar Conquista) tolerant to drought periods and BR16 standard drought sensible. When plants reached V₃ development stadium they were submitted to water deficit stress treatments following the treatments: time 0 (control), 25 mim, 50 mim, 75 mim and 100 min. for RNA extraction and cDNA synthesis, roots were collected from each treatment. Results from relative quantification showed that all transcription factors indicated higher expression levels in plants submitted to water deficit when compared to control plants. These data confirmed that these transcription factors participated in important metabolic pathways of drought responses, as already described in previous works and in the literature. Thus, future steps in this study would be the construction of super expression or silencing cassettes, aiming to obtain soybean cultivars more tolerant to drought.

Keywords: Soybean. Deficit water. Ttranscription factors. Gene expression. Real time PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Interação entre a estrutura da cromatina com os fatores de transcrição na regulação da expressão gênica.27
- Figura 2** – Interação entre os níveis de regulação da expressão gênica em eucariotos.....29
- Figura 3** – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificada pelo gene *MYBJ7* (nº de acesso: ABI73973.1) de soja com outros membros da família MYB de: *Daucus carota* (nº de acesso; BAF49444.1); *Dendrobium sp.* (nº de acesso: AF485892_1); *Gossypium hirsutum* (nº de acesso: AF336283_1), *Lotus japonicus* (nº de acesso: BAG12895.1) e *Pisum sativum* (nº de acesso: CAA71992.1) realizado pelo programa ClustalX. * significa seqüências consensus. O domínio R2 está destacado com um traço vermelho, o domínio R3 com um traço azul e os triptofanos regularmente espaçados destacados em amarelo.....46
- Figura 4** – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificada pelo gene *MYBJ7* (nº de acesso: ABI73973.1) de soja com membros da família MYB também de soja: *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81732.1); *MYB29A1* (nº de acesso: BAA81730.1); *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81733.2); *MYB60* (nº de acesso: ABH02908.1); *MYB78* (nº de acesso: ABH02914.1); *MYB161* (nº de acesso: ABH02906.1); *MYB71* (nº de acesso: ABH02912.1); *MYBJ6* (nº de acesso: ABI73972.1); *MYB92* (nº de acesso: ABH02844.1); *MYB185* (nº de acesso: ABH02841.1) e *MYBZ2* (nº de acesso: ABI73970.1), realizado pelo programa ClustalX. * significa seqüências consensus. O domínio R2 está destacado com um traço vermelho, o domínio

R3 com um traço azul e os triptofanos regularmente espaçados destacados em amarelo.....48

Figura 5 – Árvore filogenética construída a partir de um alinhamento realizado com as seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes membros da família MYB de soja: *MYBJ7* (nº de acesso: ABI73973.1) de soja com membros da família MYB também de soja: *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81732.1); *MYB29A1* (nº de acesso: BAA81730.1); *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81733.2); *MYB60* (nº de acesso: ABH02908.1); *MYB78* (nº de acesso: ABH02914.1); *MYB161* (nº de acesso: ABH02906.1); *MYB71* (nº de acesso: ABH02912.1); *MYBJ6* (nº de acesso: ABI73972.1); *MYB92* (nº de acesso: ABH02844.1); *MYB185* (nº de acesso: ABH02841.1) e *MYBZ2* (nº de acesso: ABI73970.1) com *D. carota* (nº de acesso; BAF49444.1); *Dendrobium sp.* (nº de acesso: AF485892_1); *G. hirsutum* (nº de acesso: AF336283_1), *L. japonicus* (nº de acesso: BAG12895.1) e *P. sativum* (nº de acesso: CAA71992.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.....49

Figura 6 – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *bZIP50* (nº de acesso ABI34644.1) de soja com outros membros da família bZIP em *Phaseolus vulgaris* (nº de acesso: AF350505_1); *P. acutifolius* (nº de acesso: AAK01953.1); *Cicer arietinum* (nº de acesso: BAA76425.1); *Lycopersicon sculentum* (nº de acesso: AAD55394.1); e *Solanum chacoense* (nº de acesso: ACB32232.1); realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consensos50

Figura 7 – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos de membros da família bZIP de soja; *bZIP50* (nº de acesso: ABI34644.1);

bZIP43 (nº de acesso: ABI34685.1); *bZIP21* (nº de acesso: ABI34695.1); *bZIP48* (nº de acesso: ABP88222.1); *bZIP57* (nº de acesso: ABI34683.1); *bZIP58* (nº de acesso: ABP88224.1) e *bZIP85* (nº de acesso: ABP88224.1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consensos. O domínio bZIP está destacado em vermelho51

Figura 8 – Árvore filogenética construída a partir de um alinhamento realizado com seqüências gênicas presentes em membros da família bZIP de soja: *bZIP50* (nº de acesso: ABI34644.1); *bZIP43* (nº de acesso: ABI34685.1); *bZIP21* (nº de acesso: ABI34695.1); *bZIP48* (nº de acesso: ABP88222.1); *bZIP57* (nº de acesso: ABI34683.1); *bZIP58* (nº de acesso: ABP88224.1) e *bZIP85* (nº de acesso: ABP88224.1), com *P. vulgaris* (nº de acesso: AF350505_1); *P. acutifolius* (nº de acesso: AAK01953.1); *C. arietinum* (nº de acesso: BAA76425.1); *L. sculentum* (nº de acesso: AAD55394.1); e *S. chacoense* (nº de acesso: ACB32232.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.....53

Figura 9 – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *C2H2* (nº de acesso: ABQ53139.1) de soja com membros da família C2H2 encontradas em *Brassica napus* (nº de acesso: ABB52061.1), *Oryza sativa* (nº de acesso: AAP74357.1), *Triticum aestivum* (nº de acesso: ABZ80834.1) e *S. lycopersicum* (nº de acesso: ABR68563.1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX . O domínio conservado específico de plantas QALGGH está destacado em vermelho. * significa seqüências consensos55

Figura 10 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes presentes em membros da família C2H2 de soja: *C2H2* (nº de acesso: AAZ03389.1); *C2H2* (nº de acesso: ABQ53139.1);

CYS2-HIS2 (nº de acesso: CAK24965.1); C2-H2 (nº de acesso: ABX56674.1) e C2-H2 (nº de acesso: ACA24108.1); com *O. sativa* (nº de acesso: AAP74357.1); *A. thaliana* (nº de acesso: NP_180262.1); *B. napus* (nº de acesso: ABB52061.1); *T. aestivum* (nº de acesso: ABZ80834.1); *S. latifolia* (nº de acesso: AAY40248.1); *S. lycopersicum* (nº de acesso: ABR68563.1); *L. japonicus* (nº de acesso: BAG50062.1) e *M. trunculata* (nº de acesso: ABE91967.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.....56

Figura 11 – Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *NAC2* (nº de acesso: AAY46122.1) de soja com membros da família NAC presentes em *Prunus mume* (nº de acesso: BAE48667.1), *Citrus sinensis* (nº de acesso: ABQ96643.1), *Triticum aestivum* (nº de acesso: AAU08786.1), *O. sativa* (nº de acesso: ABD52007.1), *Solanum tuberosum* (nº de acesso: ABK96797.1) e *P. vulgaris* (nº de acesso: AF402603_1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consenso58

Figura 12 – Alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *NAC2* (nº de acesso; AAY46122.1) de soja com outros membros da família NAC também de soja: *NAC2* (nº de acesso; AAX85979.1); *NAC1* (nº de acesso; AAY46121.1); *NAC1* (nº de acesso; AAX85978.1); *NAC3* (nº de acesso; AAY46123.1); *NAC3* (nº de acesso; AAX85980.1); *NAC4* (nº de acesso; AAX85981.1); *NAC4* (nº de acesso; AAY46124.1); *NAC5* (nº de acesso; AAY46125.1); *NAC5* (nº de acesso; AAX85982.1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consenso.....59

Figura 13 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes membros da família NAC de soja: *NAC2* (nº de acesso;

AAY46122.1); *NAC2* (nº de acesso; AAX85979.1); *NAC1* (nº de acesso; AAY46121.1); *NAC1* (nº de acesso; AAX85978.1); *NAC3* (nº de acesso; AAY46123.1); *NAC3* (nº de acesso; AAX85980.1); *NAC4* (nº de acesso; AAX85981.1); *NAC4* (nº de acesso; AAY46124.1); *NAC5* (nº de acesso; AAY46125.1); *NAC5* (nº de acesso; AAX85982.1); *P. mume* (nº de acesso; BAE48667.1); *C. sinensis* (nº de acesso; ABQ96643.1); *T. aestivum* (nº de acesso; AAU08786.1); *P. vulgaris* (nº de acesso; AF402603_1); *O. sativa* (nº de acesso; ABD52007.1) e *S., tuberosum* (nº de acesso; ABK96797.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.....61

Figura 14 – Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *MYBJ7*, em raízes das cultivares de soja, tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.....62

Figura 15 – Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *NAC2* em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.....66

Figura 16 – Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *bZIP50* em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e, sensível BR16, submetidas aos tratamentos de estresse de hídrico: 0 min (controle sem estresse), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.....69

Figura 17 – Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene <i>C2H2</i> em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tempos de tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.....	71
Figura 18 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene <i>NAC2</i>	100
Figura 19 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene <i>C2H2</i>	101
Figura 20 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene <i>bZIP50</i>	102
Figura 21 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene <i>MYBJ7</i>	103
Figura 22 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do normalizador <i>fi-ACTINA</i>	104

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Genes diferencialmente expressos identificados em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de microarranjos de cDNA STOLF, (2007). T1 = *bulk* de 25 min + 50 min de estresse; T2 = *bulk* de 75 min + 100 min de estresse hídrico, induzido por desidratação73
- Tabela 2** – Eficiência dos *primers* dos genes alvo e do controle endógeno utilizados.....99
- Tabela 3** – Expressão gênica relativa do gene MYBJ7 em raízes de soja, das cultivares tolerante conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT – qPCR, com a separação dos bulks utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de Cdna105
- Tabela 4** – Expressão gênica relativa do gene bZIP50 em raízes de soja, das cultivares tolerante conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT – qPCR, com a separação dos bulks utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA106
- Tabela 5** – Expressão gênica relativa do gene C2H2 em raízes de soja, das cultivares tolerante conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT – qPCR, com a separação dos bulks utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA.107
- Tabela 6** – Expressão gênica relativa do gene NAC2 em raízes de soja, das cultivares tolerante conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT-qPCR, com a separação dos bulks utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNAa.108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	MECANISMOS MOLECULARES DE RESPOSTA DA PLANTA A SECA	21
2.2	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	26
3	ARTIGO	38
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	97
ANEXO A –	Protocolo de Extração de RNA Total Utilizando Trizol	98
ANEXO B –	Eficiência dos <i>primers</i> dos genes alvo e do controle endógeno utilizados	99
ANEXO C –	Curvas de dissociassãõ dos genes alvo <i>bZIP50</i> , <i>C2H2</i> , <i>MYBJ7</i> e <i>NAC2</i> e do normalizador <i>p-ACTINA</i>	100
ANEXO D –	Tabelas de análise de expressãõ gênica por RT qPCR dos genes <i>Bzip50</i> , <i>C2H2</i> , <i>MYBJ7</i> e <i>NAC2</i>	105

1 INTRODUÇÃO

Em nível mundial, a soja é o principal grão cultivado e, na última safra (2006/2007), participou com cerca de 60% do total de 385 milhões de toneladas de grãos produzidos globalmente (DALL'AGNOL et al., 2007). Por ser o mais importante produto nacional de exportação, a soja sustenta o agronegócio brasileiro, respondendo por 8,97 bilhões de dólares ou 21,8% do total de exportações de produtos agropecuários nacionais. O Brasil também exporta o farelo e o óleo de soja, porém, em quantidades menores que o grão (CONAB, 2007).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com claras indicações que será o primeiro ainda no decorrer dessa década, em razão das limitações de área para expansão da cultura nos demais países produtores e do domínio tecnológico que o Brasil possui para produzir em regiões tropicais com baixas latitudes. (DALL'AGNOL et al., 2007). Na safra 2006/07, a sojicultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares, totalizando uma produção de 58,4 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, somaram uma produção de 86,77 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira é de 2.823 kg/ha, porém, no estado do Mato Grosso, maior produtor nacional, esses números podem alcançar cerca de 3.000 kg/ha. No Paraná, segundo estado produtor, a produtividade alcançou 2.995 kg/ha (EMBRAPA, 2008).

Dentre todos os fatores inerentes à produção agrícola, o clima aparece como aquele de mais difícil controle e com maior ação limitadora às máximas produtividades. Aliado a isto, a imprevisibilidade das variações do clima confere à ocorrência de adversidades climáticas o principal fator de risco e de insucesso na exploração das principais culturas (FARIAS et al., 2007). Estresses abióticos, como salinidade, seca, baixas temperaturas e metais pesados afetam severamente a produtividade das plantas (GORANTLA et al., 2007), e dentre esses fatores, a seca destaca-se como um limitante na produção das culturas e na distribuição das plantas por todo o mundo (XU et al., 2007).

O déficit hídrico provoca respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, incluindo o fechamento estomático, a redução do crescimento e da fotossíntese e a ativação da respiração, que afetam consideravelmente o crescimento e o desenvolvimento vegetal (DAÍ et al., 2007). Na soja, secas severas durante a floração e o enchimento de grãos induzem alterações fisiológicas como o fechamento estomático e o enrolamento de folhas e, como conseqüência, causam a queda prematura de folhas e flores e o abortamento de vagens, resultando na redução do rendimento final de grãos (EMBRAPA, 2006).

Atualmente, as perdas relacionadas à seca constituem-se no principal problema para a produção de grãos e, nas últimas décadas, esses eventos têm aumentado, provavelmente associados às mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta (STOKSTAD, 2004). Previsões indicam que fatores climáticos extremos tenderão a aumentar, incluindo secas mais freqüentes e prolongadas (SCHIERMEIER, 2006). Segundo estimativas, nos últimos anos, os estresses abióticos causaram perdas de mais de 50% na produção (BRAY et al., 2004), sendo que a seca, especificamente, pode provocar perdas de mais de 15% no campo (POROYKO et al., 2007). Para a sojicultura, os dados mostram que as perdas resultantes do déficit hídrico são constantes. Somente na safra brasileira de 2005/2006, esses números atingiram 3,8 milhões de toneladas, correspondendo a 17,7% do potencial produtivo (AEN - PR, 2007). As conseqüências das perdas relacionadas à seca são enormes, uma vez que não somente produtores, mas toda a sociedade é afetada. Desemprego, aumento no preço de alimentos e instabilidade no mercado financeiro são somente algumas das conseqüências (NEPOMUCENO et al., 2001).

Entre as alternativas para amenizar os problemas da insuficiência de chuvas está o uso da irrigação. Entretanto, fatores econômicos e, principalmente, disponibilidade de recursos hídricos aparecem como sérios obstáculos para a utilização desta estratégia. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico. No entanto, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens mais tolerantes, como quantificar o efeito do estresse, seja pela falta de metodologia de avaliação, em razão da complexidade dos mecanismos envolvidos, ou pela instabilidade e intensidade da ocorrência do fator de

estresse. Além disso, a tolerância à seca é considerada uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada somente pelo melhoramento genético convencional (BEEVER, 2000).

Assim, visando o desenvolvimento de plantas que possam suportar períodos mais longos de estiagem e/ou que possam tolerar estresses abióticos, pesquisas em biotecnologia, especialmente na área de biologia molecular, têm papel fundamental. Varias técnicas desenvolvidas nos últimos anos, têm permitido a análise da expressão gênica de várias espécies em nível global e/ou pontual.

Trabalhos com técnicas moleculares como Microarranjos de DNA, que possibilita a análise simultânea de milhares de genes (TALAMÈ et al., 2007; JUNG et al., 2008), e PCR quantitativo em tempo real (RT - qPCR), que permite a quantificação dos níveis de RNAm de genes de interesse em diferentes condições (KAVAR et al., 2008; BIES-ETHÈVE et al., 2008), têm acelerado consideravelmente a compreensão dos mecanismos envolvidos e o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da tolerância a estresses (KASUGA et al., 2004). Estas técnicas são importantes, considerando-se que estresses abióticos como a seca desencadeiam na planta a expressão de vários genes e que os produtos desses genes agem em mecanismos de tolerância e/ou resposta ao estresse (YAMAGUCHI – SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Em trabalho recente, realizado por STOLF (2007) com microarranjos de cDNA, 145 genes foram identificados com sendo diferencialmente expressos em resposta à seca. Estes genes codificam proteínas envolvidas direta e/ou indiretamente em rotas metabólicas de resposta a estresses bióticos e abióticos e foram classificados em categorias funcionais, entre elas 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.

A técnica de microarranjos de DNA apresenta a mesma limitação de outras técnicas de análise de expressão gênica em larga escala, ou seja, a baixa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MECANISMOS MOLECULARES DE RESPOSTA DA PLANTA A SECA

A água é um dos mais importantes fatores ambientais que regulam o crescimento e desenvolvimento vegetal, e sua falta afeta seriamente o crescimento e a produtividade. O déficit hídrico (também conhecido como seca) pode ser definido como a ausência da hidratação necessária para que a planta cresça normalmente e complete seu ciclo de vida (MANIVANNAN et al., 2008; SURALTA; YAMAUCHI, 2008).

As plantas, quando submetidas a seca, apresentam acentuada redução da biomassa de raízes, caules, folhas, flores e frutos. (MAJAN; TUJETA, 2005; KALEFETOGLU; EKMEKÇY, 2005). Os primeiros sinais visíveis e evidentes da deficiência hídrica ocorrem nas folhas, que apresentam senescência prematura, no entanto as mudanças iniciais morfológicas e metabólicas acontecem nas raízes. Essas mudanças não refletem meramente na redução progressiva do conteúdo de água na planta, mas também em mudanças qualitativas e quantitativas em seu metabolismo, sugerindo que através de um grande número de mecanismos, o vegetal pode, dentro de diferentes limites, tolerar a seca e se recuperar de seus efeitos (KAVAR et al., 2008).

Neste enfoque, as raízes desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao estresse hídrico, participando de sua percepção e enviando esses sinais à parte aérea (KAM et al., 2008). O crescimento, a morfologia e a arquitetura das raízes são extensivamente modulados pela disponibilidade de água no solo (HUANG; GAO 2000; WU; COSGROVE 2000; MALAMY 2005), sendo que, em condições de déficit hídrico, seu crescimento relativo pode sofrer um aumento, facilitando a capacidade do sistema radicular em extrair água de camadas mais profundas do solo, pois para a planta, nestas condições, é importante o desenvolvimento de um sistema radicular mais profundo, melhor adaptado para a captação constante de água (MAHAJAN; TUJETA, 2005). A garantia de um sistema

radicular com uma capacidade de extração eficiente de água é característica fundamental no processo de adaptação à seca (KAM et al., 2008).

Em razão das características funcionais que a água desempenha na planta, como turgor celular, meio de transporte, solvente em reações e processos celulares, quando esta falta na célula a regulação não permanece por muito tempo e, normalmente, o metabolismo é interrompido. O acúmulo de íons, como resposta à falta de água, pode danificar a célula vegetal, provocando o rompimento de membranas e causando a desnaturação de proteínas. Como resultado desta limitação hídrica, aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos e proteínas não interagem mais com esta e, sem essas interações, proteínas são desnaturadas e enzimas inibidas. Outro fato importante que ocorre no metabolismo celular durante a falta de água é a degradação de ácidos nucléicos (KAEFETOLGLU; EKMEKÇÍ, 2005).

De modo geral, as respostas moleculares comuns aos estresses ambientais têm sido intensivamente estudadas já há alguns anos e vários trabalhos mostram que estes mecanismos envolvem uma complicada rede de sinalização metabólica que controla a percepção desses sinais de estresses ambientais, a geração de mensageiros secundários e de sinais de tradução. Assim, o entendimento profundo desses processos moleculares é vital para a agricultura desenvolvida em áreas áridas e semi-áridas do mundo (SHAO et al., 2007). A resposta das plantas a estresses abióticos é complexa, envolve muitos genes e mecanismos bioquímicos e moleculares. A elucidação do controle molecular dos mecanismos de tolerância a estresses abióticos como a seca, ainda está em andamento; no entanto, futuramente, aliando a estes conhecimentos ferramentas moleculares, será possível o desenvolvimento de plantas mais tolerantes, baseado na expressão de genes de resposta a estresses específicos (WANG et al., 2003).

Uma importante resposta das plantas à desidratação é a osmorregulação. Açúcares como rafinose (RFO), sacarose, trehalose e sorbitol, açúcares ácidos como manitol, aminoácidos como a prolina, aminas como a glicina betaína e as poliaminas se acumulam sob estresses de seca, funcionando como osmólitos, mantendo o turgor e estabilizando proteínas e estruturas celulares durante o estresse. Diversos genes envolvidos na produção desses osmólitos têm sido estudados

buscando-se o aumento da tolerância a estresses abióticos em plantas (SEKI et al., 2007). Dentre os açúcares citados, a trehalose destaca-se por ser um dos mais efetivos osmoprotetores, no que se refere a concentrações mínimas exigidas (INGRAN; BARTLES, 1996). Em trabalho recente, com *Arabidopsis thaliana* e tabaco, Karim et al., (2007) conseguiram desenvolver plantas transgênicas contendo os genes *TPS1* e/ou *TPS2*, que participam da via que resulta na síntese da trehalose, resultando em plantas com maior concentração de trehalose e tolerantes à seca, sem efeitos indesejados.

Ainda, devido a sua importância na tolerância das plantas a estresses abióticos, a galactinol sintase (GolS), enzima chave na produção de rafinose (RFOs), tem sido muito estudada. A GolS sintetiza galactinol a partir de UDP-Galactose e mioinositol, que atua como um doador de galactosil na síntese de rafinose, estaquiose e verbascose (PETERS et al., 2007; PANIKULANGARA et al., 2004). Utilizando a técnica de RT - qPCR, foram encontrados altos níveis de expressão do gene *GmGOLS* em folhas de soja das cultivares Conquista e BR16, submetidas a condições de déficit hídrico, comprovando que este gene provavelmente está envolvido em respostas a seca (STOLF, 2005).

A prolina, outro osmoprotetor, possui em seu processo de síntese uma importante enzima, a P5CS. Yamada et al., (2005), trabalhando com petúnias transgênicas superexpressando os genes *AtP5CS* e *OsP5CS*, verificaram que as mesmas mostraram um aumento na síntese de prolina, e, conseqüentemente, um aumento na tolerância à seca.

Também sob condições de estresse, as proteínas LEA (*Late Embryogenesis abundant*), que estão presentes durante estágios avançados da embriogênese (HONG-BO et al., 2005) e são produzidas em muitos órgãos da planta durante seu desenvolvimento, são acumuladas (KALEMBA; PUKACKA, 2008). A superexpressão de alguns genes *LEA* e *LEA-LIKE* tem sido relatada como promovendo, em plantas, um aumento de tolerância à desidratação (HUANG et al., 2008). Sugere-se que seu papel na resposta a estresses seja de chaperonas moleculares, promovendo a estabilização de proteínas ou membranas (CHAVES; OLIVEIRA, 2004). Em recente trabalho de POLIZEL (2007) com soja transformada com a construção *rd29/DREB1A*, foram constatados altos níveis de expressão desta classe de proteínas, indicando que

esse gene faz parte da cascata de genes regulados por *DREB1A*, um importante fator de transcrição, que comprovadamente regula resposta vegetais ao déficit hídrico.

Ainda, uma das mais importantes respostas das plantas à seca é a produção do fitohormônio ácido abscísico (ABA) (SEKI et al., 2007). Esse fitohormônio desempenha um importante papel na adaptação de tecidos vegetais a estresses abióticos como a seca e a alta salinidade, assim como na maturação e na dormência de sementes (SHINOZAKI et al., 2003). O ABA promove o fechamento estomático em células guarda, mediando o efluxo de solutos e regulando a expressão de muitos genes, que podem agir na tolerância à desidratação em tecidos vegetativos e sementes (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Muitos genes induzidos por seca são também induzidos por tratamento de ABA exógeno, enquanto outros não o são. Análises moleculares têm demonstrado a existência de sistemas regulatórios dependentes e não dependentes de ABA na rede regulatória transcricional sob condições de seca (SEKI et al., 2007). Diversos genes induzidos por ABA possuem em suas regiões promotoras a seqüência conservada, ACGTGGC, denominada ABRE (*ABA responsive element*). O ABRE funciona como um elemento que atua de maneira *cis* ao DNA, participando da regulação via ABA, da expressão de genes relacionados a estresses abióticos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Alguns fatores de transcrição têm sido sugeridos como reguladores de respostas a estresses. Estes fatores são classificados dentro de diversas famílias, baseado principalmente na estrutura de seus domínios de ligação ao DNA (*DNA-binding domain*). Assim, membros das famílias MYB, ERF, bZIP e WRKY (SINGH et al., 2002; JUNG et al., 2008) são apontados como relacionados a estresses abióticos. Além destes citados anteriormente, outros fatores de transcrição estão envolvidos na resposta a estresses e têm sido alvos de muitos estudos e trabalhos. A família de fatores de transcrição MYC está envolvida na resposta das plantas a estresses abióticos como a seca, tendo sua expressão induzida por tratamento com ABA, seca e alta salinidade (KIM, 2006). O aumento da expressão de genes *AtMYC2*, membro da família MYC em *A. thaliana*, resultou em plantas com alta sensibilidade ao ABA, uma vez que esses fatores de transcrição atuam em genes que possuem a seqüência conservada ABRE, conferindo tolerância ao estresse osmótico (ABE et al., 2003).

A superfamília de AP2/ERF (APETALA2/Fator de Resposta ao Etileno - inicialmente denominada EREB), é a segunda maior família de fatores de transcrição em plantas e está presente em todo o reino vegetal, sendo caracterizada em diversas espécies vegetais (TANG et al., 2007). Atuam em diversas vias regulatórias de resposta a estresses bióticos e abióticos e atuam em resposta ao etileno (MANTIRI et al, 2008). Esta família está subdividida em quatro subfamílias: AP2, ERF, RAV e DREB (ZHUANG et al, 2008), sendo que essa última vem sendo muito estudada devido ao papel que desempenha em respostas a estresses abióticos como seca, frio e salinidade.

HIROTA et al. (2007), trabalhando com *A. thaliana* superexpressando o gene *PUCHI*, pertencente à subfamília AP2, verificaram que este gene está relacionado complexo inicial de desenvolvimento de raízes laterais. Com a superexpressão do gene *HARDY* (HRD), membro da subfamília ERF em arroz, KARABA et al., (2007) obtiveram plantas transformadas mais tolerantes à seca e à alta salinidade, que apresentaram aumento na eficiência do uso da água, na razão produção de biomassa por uso da água, aumento na assimilação da taxa fotossintética e redução da transpiração.

Plantas de *A. thaliana* superexpressando o fator de transcrição *ZmNFYB2*, pertencente a família de fatores de transcrição NF-Y, também conhecida como família HAP ou CAAT, oriundo de milho, também mostraram aumento das respostas fisiológicas de tolerância à seca, tais como condutância estomática, temperatura da folha, redução da murcha e manutenção da fotossíntese (NELSON et al., 2007).

Os genes que codificam fatores de transcrição denominados DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*), pertencentes a subfamília DREB tem sido alvo de muitos estudos. Estes fatores estão envolvidos na ativação de vários outros genes, responsáveis por mecanismos de proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular (SHINOZAKI; YAMAGUCHI - SHINOZAKI, 2000).

Em trabalhos utilizando a construção *rd29/AtDREB1A* foi constatado que as plantas de soja transgênicas tiveram a ativação desses genes de resposta à seca, durante a desidratação, resultando em plantas mais tolerantes (POLIZEL, 2007; BENEVENTI, 2006). Plantas de *A. thaliana*, contendo o gene *GmDREB2*, mostraram-se mais tolerantes à seca e à alta salinidade, sendo que a expressão deste gene pode ser

dependente ou não de ABA (CHEN et al., 2007). O fator de transcrição DREB2A também foi ativado em resposta à desidratação em plantas transgênicas, conferindo maior tolerância à desidratação e também ao calor (SAKUMA et al., 2006; QIN et al., 2007).

2.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A eficiência dos mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam fenômenos biológicos tais como diferenciação, controle celular, desenvolvimento e resposta a estímulos ambientais está estritamente relacionada com a fina regulação da expressão gênica. Esta regulação assegura que uma determinada proteína seja produzida em sua exata quantidade, no exato momento e no local apropriado para que sua função biológica no desenvolvimento do organismo seja cumprida (NÄÄR et al, 2001).

Deste modo, a regulação da expressão gênica personifica o sustentáculo principal para o desenvolvimento das plantas em respostas aos estímulos ambientais (ROOK et al., 2006). Em células eucarióticas, a indução da expressão gênica e da atividade de proteínas biologicamente ativas pode ser regulada em diversos níveis (FERREIRA, 2006), que serão descritos a seguir.

O primeiro nível de regulação da expressão gênica ocorre por alterações na estrutura da cromatina. As proteínas regulatórias ou fatores de transcrição (TFs) interagem com a cromatina de acordo com o grau de compactação do DNA e a presença de histonas e ilhas de metilação (Figura 1), permitindo que a RNA polimerase acesse genes específicos e inicie a sua transcrição (LI et al, 2007).

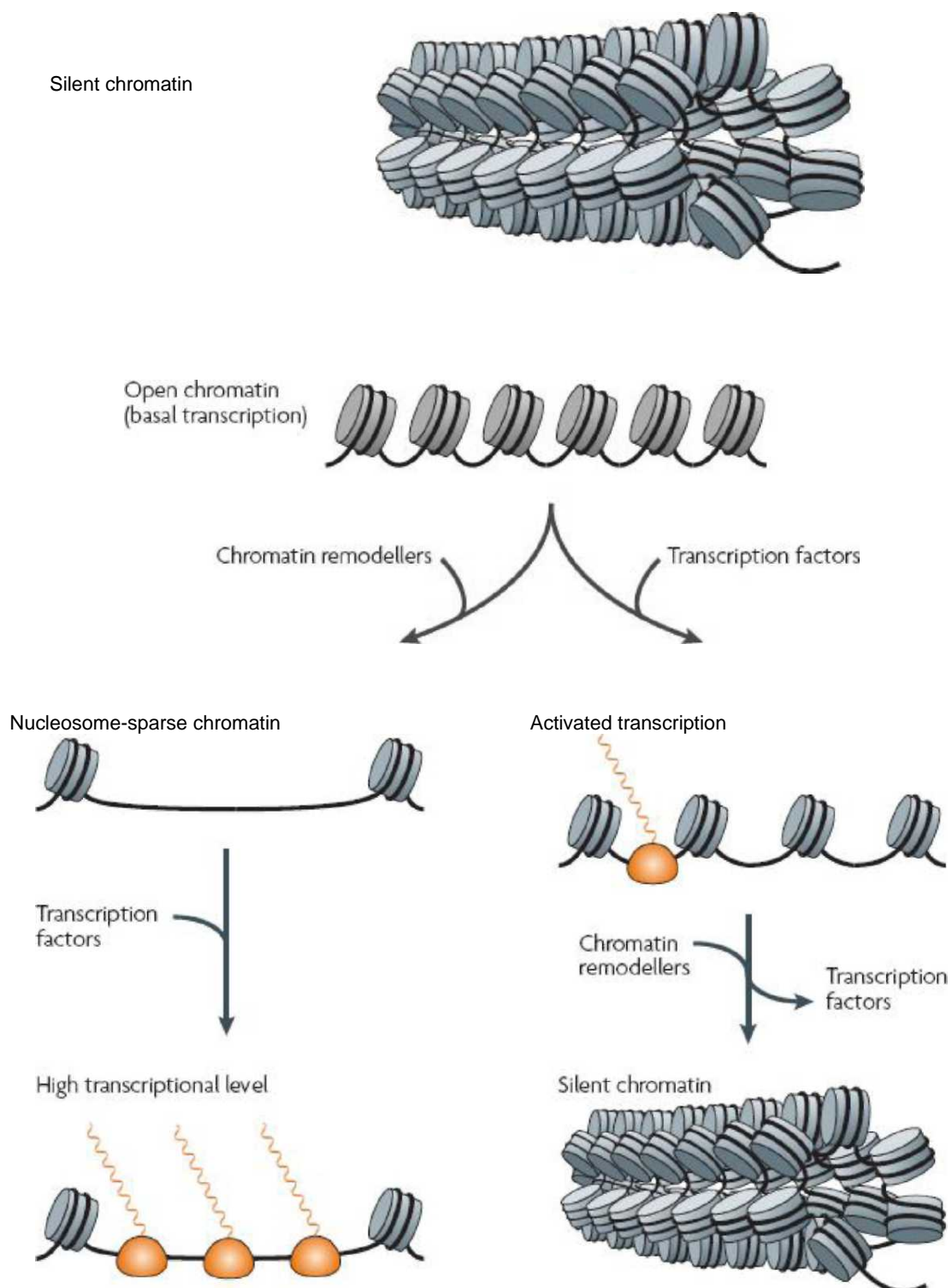


Figura 1 – Interação entre a estrutura da cromatina com os fatores de transcrição na regulação da expressão gênica.

Fonte: Komili e Silver (2008).

O segundo e principal nível de regulação da expressão gênica é a iniciação da transcrição, que pode ser afetada pela ligação de diferentes reguladores (fatores de transcrição), ao promotor do gene, agindo como ativadores ou repressores e das interações entre eles e o complexo basal de transcrição (FERREIRA, 2006).

A ocorrência de *splicings* alternativos dos RNAs mensageiros eucarióticos geram múltiplos mRNAs diferentes do mRNA precursor, representando um mecanismo de regulação da expressão gênica em eucariotos, tendo papéis importantes em diversas situações. Entre os diferentes tipos de *splicing* são variáveis a inclusão de éxons, seleção de sítios 5' e 3' alternativos, inclusão mutuamente de éxons exclusivos e retenção de íntrons (GABUT et al, 2008). Assim, o processamento e modificação pós transcricionais, evidenciam o terceiro nível regulatório.

O transporte do mRNA já processado do núcleo para o citoplasma, onde será traduzido, consiste no quarto nível de controle da expressão gênica. Trata-se de um processo complexo, conservado ao longo do processo evolutivo, essencial para a expressão gênica em todas as células eucarióticas (HAUTBERGUE et al, 2008; FARNY et al., 2008). Ao contrário dos mRNAs procarióticos, que possuem uma meia-vida de 1 a 5 minutos, a estabilidade dos mRNAs eucarióticos pode variar bastante (FERREIRA, 2006). De acordo com a ocorrência de degradação do mRNA serão determinados os níveis de expressão gênica (ISKEN; MAQUAT, 2007), desta forma, a estabilidade do mRNA constitui o quinto nível de regulação da expressão gênica.

Na iniciação da tradução encontra-se o sexto nível de regulação, e ocorre devido muitos mRNAs possuírem múltiplos códons de iniciação (ATG). A habilidade dos ribossomos em reconhecer o sítio correto pode afetar a produção da proteína (FERREIRA, 2006). Dentre as modificações pós-traducionais, sétimo nível de regulação da expressão gênica, encontram-se a sumorilação (MIURA et al, 2007), glicosilação, fosforilação (REINDERS; SICKMANN, 2007), acetilação e metilação, (MAZZUCOTELLI et al., 2008), sendo que estes mecanismos regulatórios são essenciais em diversos processos biológicos.

O transporte de proteínas para o seu sítio de ação é essencial para que possam tornar-se biologicamente ativas após a tradução (CLAYTON; SHAPIRA, 2007), sendo, portanto, este o oitavo nível regulatório. Muitas proteínas são rapidamente

degradadas, enquanto outras permanecem estáveis, fato relacionado a seqüências específicas de aminoácidos que levam à rápida degradação, o que faz com que o controle da estabilidade da proteína seja o nono nível de regulação da expressão gênica (FERREIRA, 2006).

Assim, verifica-se que existem níveis regulatórios transcricionais, traducionais e pós-traducionais, sendo que estes podem agir em separado ou interagirem no aumento ou inibição da expressão gênica (Figura 2).

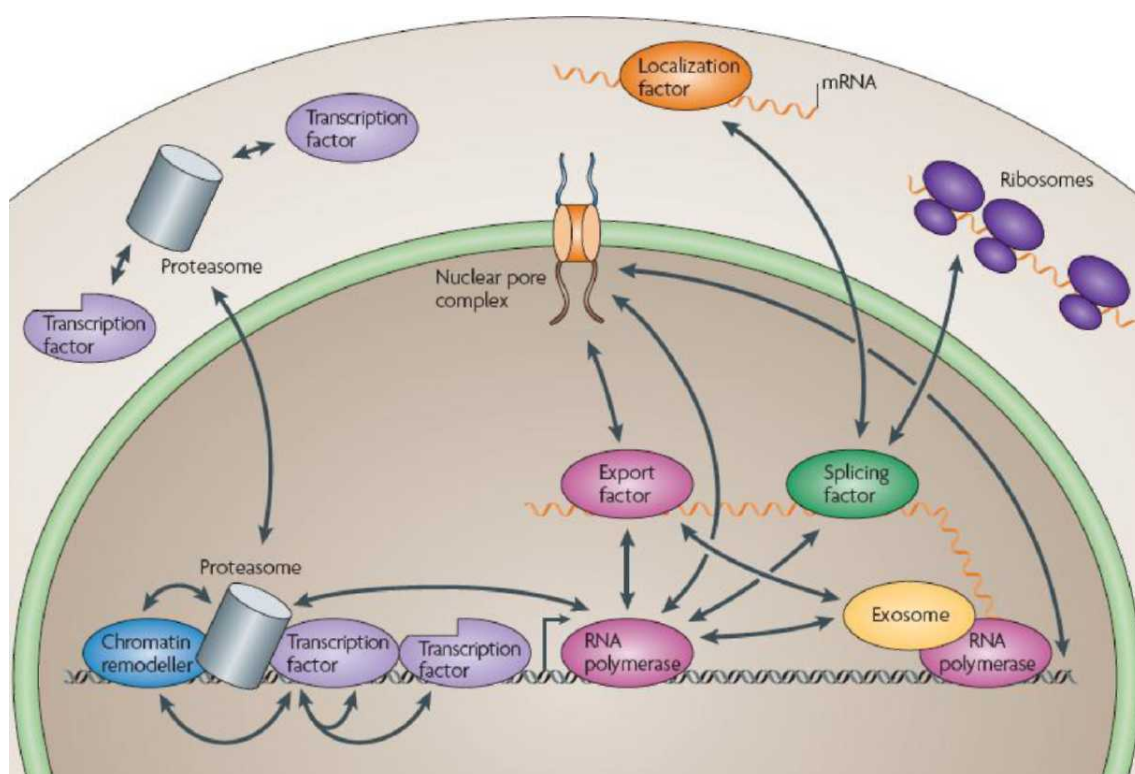


Figura 2 – Interação entre os níveis de regulação da expressão gênica em eucariotos.
Fonte: Komili e Silver (2008).

Em plantas submetidas a estresses abióticos, verifica-se que as alterações acontecem tanto em nível pós-transcricional (mRNA) quanto em nível pós-traducionais (proteínas), nas vias de regulação da expressão de genes de resposta ao estresse aplicado (MAZZUCOTELLI et al., 2008). Entretanto, apesar de serem

conhecidos todos estes níveis de regulação da expressão gênica, para a maioria dos genes a regulação que acontece durante a transcrição é sem dúvidas a principal via, e esta ocorre através da atuação dos fatores de transcrição (ROOK et al., 2006)

Os fatores de transcrição (FT) são proteínas regulatórias que modulam a expressão de grupos específicos de genes, através de seqüências específicas de ligação ao DNA e interações proteína - proteína. Eles interagem com a maquinaria geral de transcrição, agindo na cromatina, remodelando proteínas e/ou outros fatores de transcrição. Podem atuar como ativadores ou repressores da expressão gênica, mediando aumentos ou decréscimos no acúmulo de RNA mensageiro (RIECHMANN et al., 2000; BROUN, 2004).

Existem duas categorias de fatores de transcrição. A primeira é formada pelos fatores basais, necessários para a formação do complexo de pré-iniciação da transcrição, presentes em todas as células e ativos nas mais diversas condições. Na segunda categoria estão os fatores de transcrição sítio-específicos, presentes apenas nos tipos celulares onde atuam e/ou em determinado momento do ciclo de vida do organismo. Fatores sítio-específicos reconhecem e se ligam a seqüências específicas localizadas nos promotores dos genes (elementos cis), e, associados a outros componentes da maquinaria de transcrição, como fatores basais, cofatores, remodeladores de cromatina e a própria RNA polimerase II, ativam ou reprimem a síntese do mRNA (LEE; YOUNG, 2000; LIN; BARBOSA, 2002).

Os fatores de transcrição são reguladores críticos nas mudanças da expressão gênica, conduzindo processos de desenvolvimento e respostas a estresses ambientais. Mais de 1600 fatores de transcrição, representando aproximadamente 6% do número total de genes já foram identificados no genoma da *A. thaliana* (RIECHMANN et al., 2000, GONG et al., 2004, JUNG et al., 2008). A regulação transcricional é essencial para adaptação da planta a estresses abióticos. Múltiplos fatores de transcrição requeridos para a regulação transcricional, sob estresses abióticos, têm sido identificados e analisados funcionalmente (GAO et al., 2007).

Esses FTs regulam cascatas de genes que podem induzir importantes mudanças morfológicas, fisiológicas e/ou metabólicas. Muitos dos fatores de transcrição presentes nas plantas foram previamente identificados em animais e classificados de

acordo com seus domínios de ligação ao DNA (*DNA-binding*): MADS-box, homeodomínio, dedos de zinco, bZip, (zíper básico de leucina) também denominado *basic* hélice-giro-hélice, (bHLH), MYB etc. Outras famílias de fatores de transcrição ocorrem somente nos vegetais, tais como, AP2/ERF (proteínas ligadas a respostas ao etileno), WRKY (proteínas caracterizadas pela seqüência de aminoácidos WRKYCQK altamente conservada), NAC (meristema não apical do cotilédono), DOF (DNA ligado com um dedo), ARF (fator de resposta à auxina) e as proteínas AUX/IAA (auxina/indole-3-ácido acético) (MONTIEL et al., 2004).

O estudo de fatores de transcrição tem contribuído muito no entendimento das vias metabólicas de resposta das plantas a estresses abióticos, uma vez que eles têm papel fundamental em quase todos os processos biológicos (JAKOBY et al., 2002). Sendo assim, tais fatores são considerados importantes alvos tanto para a descoberta de rotas metabólicas como para a manipulação das mesmas (BROUN, 2004), visto que além de agir como moduladores das cascatas gênicas, estes ainda atuam ampliando ou inibindo a resposta de genes alvos (YANHUI et al., 2006).

Na agricultura, através de técnicas de engenharia genética, há um interesse considerável em identificar e utilizar fatores de transcrição chaves na defesa de plantas, objetivando-se, principalmente, a obtenção de cultivares com tolerância aumentada a estresses abióticos e agrotóxicos, e com maior resistência a patógenos (STOLF, 2007). Por isso, no presente estudo, os fatores de transcrição *MYBJ7*, *bZIP50*, *C2H2* e *NAC2*, descritos a seguir, foram selecionados para análises moleculares mais detalhadas, uma vez que estes apresentam características de respostas a estresses e são ativados em condições de seca.

As proteínas MYB (*Myeloblastosis*) constituem uma classe de fatores de transcrição presentes em todos os eucariotos. Foram identificados como envolvidos na regulação de processos planta-específicos, tais como a regulação do metabolismo de fenilpropanóides, o controle da especialização da morfologia das células e a regulação das respostas vegetais a estresses bióticos e abióticos (COMINELLI et al., 2008). Genes desta família têm sua expressão ativada por ABA (ABE et al., 2003). DAÍ et al., (2007), trabalhando com *A. thaliana*, demonstraram que plantas transgênicas superexpressando o fator *OsMYB3R-2*, apresentaram maior tolerância à seca, ao frio e

à salinidade. Também, em *A. thaliana*, o gene *AtMYB44* foi superexpresso resultando em plantas mais tolerantes à seca e a salinidade, através, principalmente, do mecanismo de resposta dos estômatos (JUNG et al., 2008).

Em plantas, os fatores de transcrição zíper básico de leucina (bZIP) constituem uma grande família, com 75 membros presentes em *A. thaliana* (SINGH et al., 2002). Participam de processos de regulação que incluem defesa contra patógenos, sinalização, maturação de sementes e desenvolvimento floral (JAKOBY et al., 2002). Rodriguez - Uribe e O'Connell (2006) descreveram que o fator de transcrição bZIP está envolvido na resposta adaptativa de alongação de raízes em dois tipos de feijão, submetidos à seca. Existe muita similaridade entre membros da família bZIP com os da família ABF/AREB/AB15, indicando que nestes fatores existem regiões domínio de resposta ao ABA (KIM, 2006). Genes desta família provavelmente participam ainda de processos de ajuste osmótico, uma importante resposta adaptativa das plantas à seca e outros estresses abióticos (CHAVES et al., 2003).

O domínio NAC (NAM, ATAF1, CUC2) foi originalmente definido como um domínio N-terminal altamente conservado. Seu nome deriva dos genes *NAM* (*No Apical Meristem* - meristema não apical), de petúnias, *ATAF1* e *CUC* (*Cup Shaped Cotyledon2* - cotilédone em forma de taça), de *A. thaliana*. Genes pertencentes a esta família estão amplamente presentes em plantas, mas não em outros eucariotos (GUO & GAN, 2006). Dentre suas funções biológicas estão o desenvolvimento embrionário, floral e vegetativo, a formação de raízes laterais, a sinalização de auxina e a defesa contra estresses abióticos (HE et al., 2005; OLSEN, 2005). Diversos trabalhos com genes da família NAC têm apontado que estes atuam nos processos de defesa da planta à seca e à alta salinidade, por exemplo. Em trabalho com o gene *SNAC1* em arroz, este apresentou aumento da expressão em situação de seca e alta salinidade, sendo que sua expressão predominante foi detectada em células guarda, resultando em plantas mais tolerantes a estes estresses (HU et al., 2006). Também em arroz, o gene *SNAC2* (*Stress-responsive NAC2*) quando superexpresso, levou à obtenção de plantas mais tolerantes ao frio e à salinidade (HU et al., 2008).

As proteínas dedo de zinco (ZFP) do tipo C2H2 (*Cysteine2/ histidine2*) constituem uma das maiores famílias de fatores de transcrição em eucariotos

(AGARWAL et al., 2007). Participam de diversos processos, sendo importantes no desenvolvimento e nas rotas metabólicas de muitas plantas (CHRISPEELS et al., 2000). Desempenham ainda funções na defesa das plantas a estresses abióticos como alta salinidade, frio, seca e danos mecânicos (MITSUYA et al., 2007). XU et al.,(2007), trabalhando com o gene *THZF1*, pertencente à família C2H2 em *A. thaliana*, constatou que este gene está envolvido na resposta ao estresse salino e à seca. CIFTCI-YILMAZ et al., (2007) também mostraram o envolvimento do domínio EAR na defesa de *A. thaliana* a estresse salino. A superexpressão de *OsISAP1*, um tipo de C2H2, conferiu tolerância aos estresses de frio, desidratação e salinidade em tabaco transgênico, no estágio de germinação de sementes (MUKHOPADHYAY et al., 2004).

Análise da expressão gênica

Nas últimas duas décadas, ocorreram importantes avanços no entendimento das mudanças transcricionais induzidas por estresses ambientais e ainda na identificação de proteínas de sinalização e de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes estresse - induzidos. Os resultados indicam um complexo processo constituído por diversas rotas metabólicas e iniciado pela percepção do estresse, que culmina com mudanças transcricionais específicas (MAZZUCOTELLI et al., 2008). Estes dados de pesquisa científica só foram alcançados graças ao uso de tecnologias avançadas no estudo da expressão gênica, fato decisivo, uma vez que o entendimento das respostas das plantas a estresses abióticos em nível molecular fornece embasamento para os futuros avanços da engenharia genética (ZHOU et al., 2007).

Durante os últimos anos, várias técnicas foram e estão sendo desenvolvidas com o objetivo de analisar global e/ou pontualmente a expressão gênica das espécies. Assim, a capacidade de medição simultânea da expressão de milhares de genes tornou-se um poderoso sistema analítico. A disponibilidade de novas tecnologias para este fim resulta em muitas estratégias para o estudo da resposta gênica (MITRA et al., 2003).

Técnicas para a análise diferencial da expressão de genes utilizam como alvo de estudo, principalmente os transcritos (moléculas de mRNA), que são sintetizados pelo indivíduo durante determinado tratamento, em comparação com

aqueles produzidos na ausência do mesmo. A análise global dos transcritos de um organismo expressos em situações específicas constitui uma das áreas da era Genômica, também conhecida como Transcriptômica. (MARCELINO et al., 2007).

Recentes progressos na biologia molecular, na genômica (estudo do genoma), na proteômica (estudos das proteínas sintetizadas) e na metabolômica (estudo do metabolismo) têm fornecido importantes informações sobre as relações existentes dentro do complexo sistema da rede regulatória dos genes vegetais, que são principalmente compostas por genes induzidos (fatores ambientais e sinais de desenvolvimento), expressão programada e elementos regulatórios (elementos - *cis* e elementos - *trans*), correspondendo às diferentes rotas metabólicas bioquímicas e a diversos fatores sinais (SHAO et al., 2007).

Tecnologias como ESTs (*Expression Sequence Tags* - Etiquetas de seqüências expressas), SAGE (*Serial Analysis for Gene Expression* - Análise serial da expressão gênica) ou MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) não requerem conhecimento prévio das seqüências dos transcritos, possibilitando, desta forma, a identificação de transcritos ainda desconhecidos ou não identificados (NIELSEN et al., 2003). Em diversos sistemas de plantas, as ESTs têm estabelecido uma direção aproximada para a descoberta de genes associados às respostas aos estresses, sejam abióticos ou bióticos (GORANTLA et al., 2007).

Por outro lado, a técnica de microarranjos auxilia a elucidar as bases moleculares de como diferentes plantas respondem a um estímulo em particular. Diferente das técnicas tradicionais, os microarranjos permitem análises simultâneas de um grande número de genes, de maneira imparcial. Portanto, esta metodologia é uma poderosa ferramenta nos esforços para o rápido desenvolvimento de plantas agrícolas, com tolerância à seca e a outras condições ambientais adversas (KATHIRESAN et al., 2006). No entanto, ao contrário das ESTs, sua eficiência é baseada no conhecimento prévio dos genes, utilizando-se de sondas que são desenhadas para se hibridarem a transcritos conhecidos (KUO et al., 2002).

Apesar de analisar a expressão de centenas de genes simultaneamente, técnicas de análise da expressão gênica em larga escala como os microarranjos de DNA, apresentam baixa sensibilidade comparativa. Atualmente a

técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (RT - qPCR) apresenta-se como a metodologia mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene, oferecendo ainda dados rápidos e reprodutíveis (GINZINGER, 2002).

A revolução da técnica de RT - qPCR consiste na possibilidade de monitorar, ciclo a ciclo, a amplificação dos fragmentos de DNA ou RNA, proporcionando uma quantificação precisa dos ácidos nucleicos e com maior reprodutibilidade dos resultados, uma vez que os valores são determinados durante a fase exponencial da reação de PCR. O ponto que o equipamento detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível dos produtos amplificados, baseando-se na fluorescência emitida (NOVAIS et al., 2004). Existe uma relação direta entre a quantidade inicial de seqüências alvo e a quantidade final de produtos amplificados e acumulados a cada ciclo. Outro diferencial da técnica está na eliminação de processos pós-ciclagem, como a eletroforese, diminuindo assim erros e contaminações (BUSTIN, 2000; KUBISTA et al., 2006).

Em todas as reações de RT - qPCR deve se utilizar um normalizador, que funciona como uma referência ativa que normaliza a quantificação de um mRNA alvo, eliminando diferenças na quantidade de RNA total adicionada a cada reação. Os genes utilizados como normalizadores são normalmente genes constitutivos, que não alteram seu padrão de expressão em função de tratamentos utilizados, fase de desenvolvimento, tecido, etc (WALL; EDWARDS, 2002; BRUNNER et al., 2004). Alguns exemplos de normalizadores são os genes que codificam para o RNAR18S, o gene *GLICERALDEÍDO-3-FOSFA TO-DESIDROGENASE (GAPDH)*, *p-ACTINA* e *LECTINA*, sendo que em soja, em experimentos com seca, os dados mostraram que o normalizador mais apropriado é a *p-ACTINA* (STOLF, 2007).

A princípio utilizava-se a substância carcinogênica brometo de etídio nas reações de PCR em tempo real. Com o aprimoramento da metodologia, foram desenvolvidas outras técnicas, utilizando fluoróforos, que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico para acompanhar cada ciclo de reação que o substituíram, sendo que dentre as técnicas desenvolvidas, as mais

utilizadas atualmente são o SYBR Green® e as sondas Taqman (NOVAIS et al., 2004; GINZINGER, 2002).

O SYBR Green® é um fluoróforo que quando em solução, esta molécula emite pouca fluorescência, no entanto, quando ligada a uma molécula fita dupla de DNA, emite um forte sinal e, sob excitação, emite luz. Assim, com o acúmulo do produto amplificado, a fluorescência aumenta proporcionalmente e é detectada. É um método simples e econômico, sem necessidade de síntese de sondas específicas, de baixo custo, facilidade de uso e sensibilidade. A desvantagem da técnica é que a molécula do *dye* liga-se a qualquer fita dupla de DNA, inclusive, produtos inespecíficos de amplificação e/ou dímeros de *primers*, superestimando o resultado final, uma vez que o sinal de fluorescência emitido pode corresponder a ambos os fragmentos, específicos ou não (AMBION, 2007; KUBISTA et al., 2006). Uma alternativa para averiguar se houve a participação de produtos de amplificação inespecíficos em parte da fluorescência gerada, ou até mesmo dímeros de *primers*, é a construção de uma curva de dissociação ao final da PCR. Os produtos são vagarosamente desnaturados e, considerando que cada molécula de DNA dupla fita apresenta um temperatura de desnaturação específica, é possível identificar a existência de amplificação inespecífica (MARCELINO, 2006).

A metodologia *TaqMan* utiliza uma sonda para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que receber energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor), e a detecção dos produtos da reação ocorre pela atividade exonuclease 5' - 3'da *Taq* DNA polimerase, que ao clivar a sonda, esta emite fluorescência que será detectada pelo equipamento (MAO et al.; 2007 BUSTIN, 2002). Deste modo, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida (BUSTIN, 2002; BUSTIN et al., 2005).

O sistema *TaqMan* utiliza um processo denominado FRET (transferência de energia ressonante por fluorescência). O FRET é uma interação distância-dependente entre os estados excitados eletrônicos de duas moléculas *dyes*

(Fluoróforos), na qual íons excitados são transferidos de uma molécula doadora (*dye repórter*) a uma molécula receptora (*dye quencher*) sem a emissão de um fóton. Assim quando as moléculas dyes estão próximas, ocorre transferência de energia e não ocorre emissão de fluorescência, que só acontece quando os fluoróforos estão distantes espacialmente, inibindo a transferência de energia e permitindo a emissão da fluorescência (GIULIETTI et al. 2001). A reação com a *TaqMan* é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de seqüências específicas. Esse tipo de químico apresenta um custo elevado, pois a síntese de sondas específicas é necessária. No entanto, este sistema permite sua utilização em reações *multiplex*, ou seja, reações onde mais de um par de *primers* pode ser usado, detectando diferentes seqüências alvos (KUBISTA, et al, 2006).

3 ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista Brazilian Journal of Plant Physiology

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS COM TOLERÂNCIA À SECA EM RAÍZES DE SOJA

Selma dos Santos Pereira

INTRODUÇÃO

Por sua natureza séssil, as plantas suportam muitas condições ambientais adversas, o que, conseqüentemente, requer dos vegetais uma variedade de respostas de aclimação a esses estresses ambientais (GAO et al., 2007).

A importância do estudo dos genes envolvidos na resposta aos estresses ambientais, como a seca, consiste no fato de que os estresses abióticos são os causadores dos maiores problemas na agricultura, pois reduzem o crescimento, a colheita e a produtividade (GAO et al., 2007). Atualmente, as perdas relacionadas ao déficit hídrico têm sido o principal problema na produção de grãos. Eventos de seca têm aumentado nas últimas décadas, provavelmente associados às mudanças climáticas, decorrentes do aquecimento do planeta (STOKSTAD, 2004). Previsões indicam que estes fatores climáticos extremos tenderão a aumentar, em frequência e períodos de duração (SCHIERMEIER, 2006). No que se refere à cultura da soja, as perdas relacionadas à estiagem têm atingido números relevantes. Na safra 2005/2006, no Rio Grande do Sul e no Paraná, principais estados produtores dessa cultura, houve redução na produção de 10% e 14%, respectivamente (APROSSUL, 2007; AEN-PR, 2007).

Durante sua evolução, os vegetais desenvolveram mecanismos sofisticados de resposta, tais como sutis alterações das condições de crescimento e iniciação de cascatas que sinalizam para ativar genes estresses responsivos, com a

finalidade de alterar processos fisiológicos e bioquímicos (GAO et al., 2007). Tais respostas são geralmente mediadas por fatores de transcrição, que atuam em diversos mecanismos, inclusive respostas a estresses abióticos (MENG et al., 2007).

De modo geral, os fatores de transcrição, interagindo nas complexas rotas metabólicas de resposta aos estresses ambientais, induzem alterações nos níveis de expressão de alguns genes, que, em diversas situações, proporcionam o aumento da tolerância a esses estresses. A regulação transcricional é um dos mecanismos cruciais de proteção da planta às restrições impostas pelo ambiente (CHEN; ZHU, 2004). Assim, os fatores de transcrição têm papel fundamental nas respostas adaptativas das plantas, por serem grupos de proteínas que controlam os processos celulares pela regulação de genes alvo (QU; ZHU, 2006).

Centenas de genes estão envolvidos na resposta a estresses abióticos e as análises de expressão destes genes mostram a existência de diversos sistemas regulatórios estresses-responsivos (BUSTIN, 2000; SEKI et al., 2001). O advento da tecnologia de microarranjos possibilitou a identificação e investigação destes genes estresses responsivos (SEKI et al., 2002; TALAMÉ et al., 2007; JUNG et al., 2008).

Em trabalho anterior de Stolf (2007), utilizando a técnica de microarranjos de cDNA, com raízes de soja, órgãos vegetais onde ocorrem as primeiras mudanças morfológicas e metabólicas nas plantas submetidas à escassez de água (KAVAR et al., 2008), foram identificados 145 genes diferencialmente expressos em condições de seca, os quais foram categorizados de acordo com suas funções biológicas, entre estas, genes envolvidos na produção de energia, fatores de transcrição, genes envolvidos em diferentes vias anabólicas e/ou catabólicas de aminoácidos, lipídios, 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.

Devido ao importante papel dos fatores de transcrição na regulação das rotas metabólicas e em diversos tipos de respostas vegetais a estresses, essa foi a categoria escolhida para este estudo, tendo sido selecionados os genes *MYBJ7*, *bZIP50*, *NAC2* e *C2H2*, que tiveram aumento da expressão quando em condições de seca. O gene *MYBJ7*, membro da família MYB, é alvo de diversos estudos anteriores

por sua participação nas respostas das plantas à seca, sendo que vários trabalhos relatam que quando superexpresso, confere nas plantas aumento de tolerância à seca e outros estresses abióticos (JUNG et al., 2008; DAÍ et al., 2007).

O fator de transcrição *bZIP50*, (região básica de zíper de leucina), é membro da família bZIP, e participa de diversos processos de resposta da planta, como por exemplo o ajuste osmótico (RODRIGUEZ – URIBE; O'CONNELL, 2006; CHAVES et al., 2003).

Outro gene escolhido, o *NAC2* (NAM, ATAF, CUC), fator de transcrição membro da família NAC, presente apenas em plantas, participa de diversos processos fisiológicos, dentre os quais os de resposta a estresses abióticos. Em trabalhos superexpressando genes da família NAC, foram obtidas plantas tolerantes a estresses abióticos como seca, frio e alta salinidade (HU et al., 2008; HU et al., 2006).

O gene *C2H2* (Cisteína2 Histidina2), que pertence a uma família de fatores de transcrição de proteínas dedos de zinco, participa de diversas rotas metabólicas, inclusive nas de defesa vegetais à estresses abióticos (MITSUYA et al., 2007; CHRISPEELS et al., 2000).

Neste contexto, no presente trabalho foram realizados alinhamentos das seqüências de aminoácidos codificados pelos fatores de transcrição selecionados em soja, com genes de outras espécies vegetais, visando identificar seqüências consenso que os caracterizasse como pertencentes a essas famílias gênicas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar e analisar os níveis de expressão dos fatores de transcrição *MYBJ7*, *bZIP50*, *NAC2* e *C2H2*, em raízes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] submetidas ao déficit hídrico, utilizando-se a técnica de RT - qPCR. Os fatores de transcrição aqui estudados são fortes candidatos para serem usados em transformação genética, visando a obtenção de genótipos tolerantes a seca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento de Hidroponia

O experimento para a obtenção das amostras biológicas utilizadas no presente trabalho foi realizado em outubro de 2005 (STOLF 2007), nas instalações da Embrapa Soja (Londrina, PR, Brasil). Genótipos contrastantes foram assim selecionados para a análise diferencial de expressão de genes relacionados ao déficit hídrico. Com base em várias observações morfofisiológicas e agrônômicas, o genótipo MG/BR46 (cultivar Conquista) foi escolhido como cultivar padrão tolerante, pois apresenta alta capacidade de suportar períodos de seca (OYA et al., 2004), enquanto a cultivar BR16, como padrão de sensibilidade.

Sementes das duas cultivares foram germinadas em câmara de germinação climatizada e, posteriormente, as plântulas foram transferidas para sistema de hidroponia contendo solução nutritiva (HEWITT, 1963).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, consistindo de dois blocos, sendo que cada tratamento consistiu de 30 plantas, as quais cresceram em casa de vegetação até atingirem o estágio de desenvolvimento V3, quando houve a indução do déficit hídrico.

Foram aplicados cinco tratamentos: T₀ (controle não estressado), T25 (25 min de estresse), T50 (50 min de estresse), T75 (75 min de estresse) e T100 (100 min de estresse). Após a aplicação do estresse, as raízes foram coletadas, embaladas em papel alumínio, colocadas em nitrogênio líquido, e, em seguida, armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises moleculares.

Extração e quantificação de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total das amostras foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen - Life Technologies), conforme instruções do fabricante. Após a extração os RNAs foram purificados e tratados com a DNase RQ1 RNase-free DNase (Promega), conforme as recomendações do fabricante, e tiveram sua integridade verificada em gel de agarose 1%. Realizou-se ainda, a quantificação em espectrofotômetro, com leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se H₂O DEPC como controle (branco).

5'CGAACCTCTCGAACTCGTTGTT3'; para o gene *GmMYBJ7*, F 5TTGTGTCTGGAGGTGAAGCCA3' e R 5'TCACCAAACCTCTGCAGGCTACA3'; para o gene *GmC2H2* F 5'CACAGATCTTTCGTGCCATCAA3' e R 5'TTCTCATGTGCCCTCCCAA3' e para o gene *GmNAC2* F5'CGATCGAGAACTGCAACCAA3' e R 5'ACCTCCTCCGCTTTTCAGAATC3'. O gene utilizado como normalizador foi o *Gm\$-ACTINA* (Acesso No.: DQ224371.1) com a seqüência de *primers* F 5'GAGCTATGAATTGCCTGATGG3' e R 5'CGTTTCATGAATTCCAGTAGC3'.

PCR quantitativo em tempo real

Para as reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) utilizou-se o kit *Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix UDG* (Invitrogen - Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. As reações foram realizadas no termociclador *7300 Real Time System* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

Curvas de eficiência de amplificação para cada par de *primers* dos genes estudados e para os *primers* do gene normalizador foram realizadas a partir de uma série de diluições do cDNA (10 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), sendo testadas diferentes concentrações dos *primers*. Os valores de Ct obtidos em cada diluição foram plotados em função do logaritmo das diluições, e o índice de inclinação da reta foi utilizado para calcular a eficiência de cada sistema de acordo com a fórmula $E=[10^{-1/\text{slope}}]-1$. Os parâmetros de ciclagem utilizados para as reações foram: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 2min, 62°C por 1min, sendo os dados coletados neste último passo.

A concentração de *primer* com melhor desempenho na curva de eficiência foi escolhida para ser utilizada na etapa de quantificação relativa. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas, constituindo-se de 8,0 uL de água Ultra pura; 0,5 uL de ROX (referência passiva); 12,5 uL de *SYBR® Green qPCR SuperMix UDG* e 2 uL de cDNA. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2min; 95°C por 2min; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 30s, sendo os dados coletados na última etapa. Como normalizador, em cada

tratamento, utilizou-se o gene Gm(3-ACTINA (Acesso No.: DQ224371.1) que foi escolhido baseando-se em trabalho realizado por STOLF (2007), onde, este gene foi comparado a outros normalizadores utilizados na literatura, e por apresentar melhor desempenho em comparação aos outros para ensaios sob estresse hídrico, foi indicado como sendo o melhor normalizador para experimentos de seca em soja.

O nível de expressão gênica diferencial (RQ) foi calculado, pela subtração do Ct da amostra de cada tratamento com o Ct do normalizador, gerando o **ACt**. Este valor de **ACt** dos tratamentos é subtraído do valor de **ACt** da amostra controle - T₀ (calibrador), resultando num valor de **AACt**. O valor de RQ agora é calculado pela fórmula 2^{-AACt} , onde o valor 2 representa a somatória das eficiências do gene alvo (100% = 1) e do normalizador (100% = 1). Primers com eficiência acima de 75% são recomendados a serem utilizados para as reações de quantificação relativa.

Após o término da quantificação relativa, para verificar a formação de dímeros de *primers*, amplificações inespecíficas e possíveis erros e contaminações, realizou-se a curva de dissociação.

A placa de PCR para quantificação relativa da expressão gênica diferencial foi montada em triplicata, com duas repetições biológicas para cada gene e tratamento em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alinhamento das seqüências escolhidas para RT - qPCR

A fim de determinar a classificação dos fatores de transcrição utilizados neste trabalho, a seqüência predita dos aminoácidos codificados por genes pertencentes às famílias de fatores de transcrição MYB, bZIP, C2H2 e NAC foi alinhada com a utilização do programa ClustalX. Os alinhamentos foram realizados comparando somente membros destas famílias presentes em soja e também fazendo a comparação de membros de soja com os de outras espécies vegetais.

Assim, a seqüência predita de aminoácidos do gene *MYBJ7* de soja foi alinhada com seqüências de genes da família MYB, presente em outras espécies

vegetais (Figura 3). Uma seqüência conservada foi encontrada, caracterizando este gene como pertencente a esta família de fatores de transcrição.

A principal característica dessa família gênica é a presença do domínio conservado MYB, geralmente composto de uma a três repetições imperfeitas de 51 ou 52 aminoácidos, existindo ainda, três hélices, com a segunda e terceira hélices formando a estrutura de ligação ao DNA *helix-turn-helix* (CHEN et al., 2005). Geralmente, estão também presentes três resíduos de triptofano, regularmente espaçados a cada repetição MYB. Estes participam na conformação hidrofóbica que, presume-se, esteja envolvida no reconhecimento específico do DNA (YANHUI et al., 2006).

As proteínas MYB são classificadas em 3 grupos principais: R1R2R3-MYB, com 3 repetições adjacentes, *MYB-related*, grupo heterogêneo de proteínas, que geralmente apresenta uma única repetição, e R2R3-MYB, com 2 repetições adjacentes (YANHUI et al., 2006). Neste último grupo, está classificado o gene *MYBJ7*, conforme mostrado nas Figuras 3 e 4.

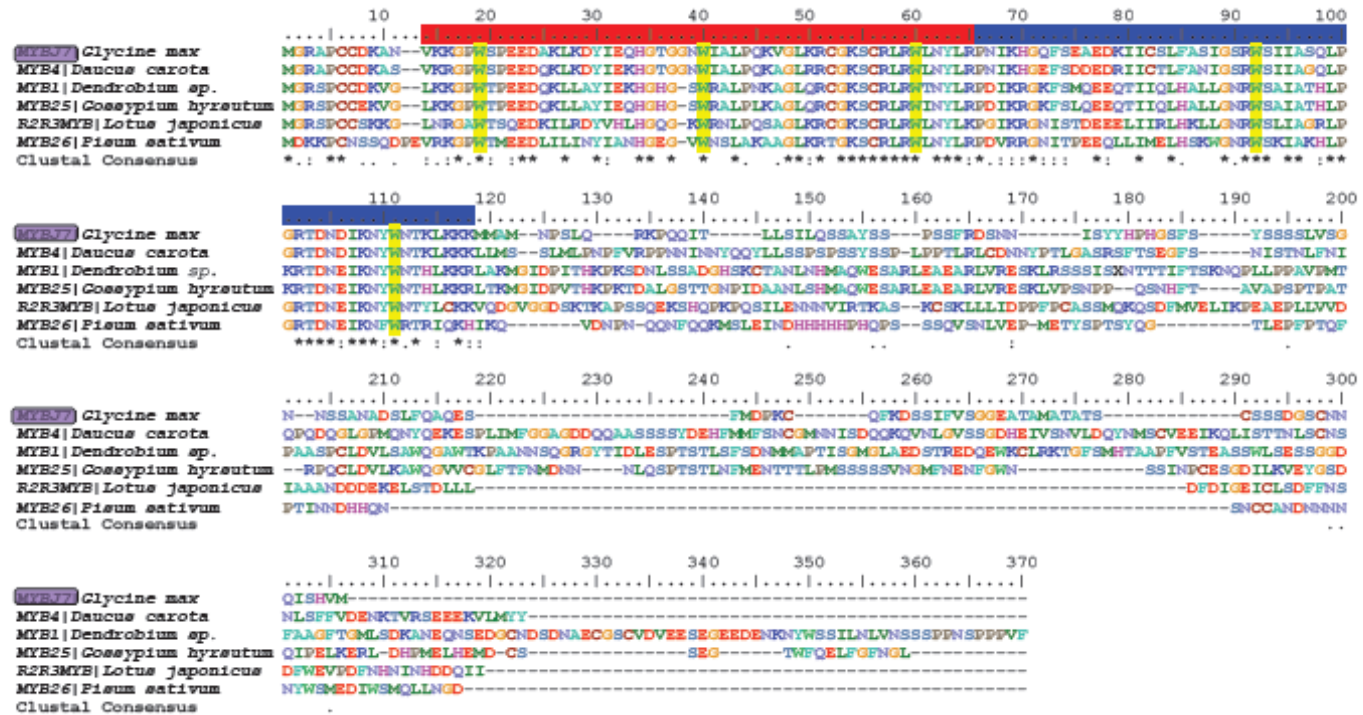


Figura 3 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificada pelo gene *MYBJ7* (nº de acesso: ABI73973.1) de soja com outros membros da família MYB de: *Daucus carota* (nº de acesso; BAF49444.1); *Dendrobium sp.* (nº de acesso: AF485892_1); *Gossypium hirsutum* (nº de acesso: AF336283_1), *Lotus japonicus* (nº de acesso: BAG12895.1) e *Pisum sativum* (nº de acesso: CAA71992.1) realizado pelo programa ClustalX. * significa seqüências consensos. O domínio R2 está destacado com um traço vermelho, o domínio R3 com um traço azul e os triptofanos regularmente espaçados destacados em amarelo.

O alinhamento das seqüências preditas de aminoácidos somente de membros da família MYB de soja (Figura 4) permitiu elevada semelhança entre as seqüências. Constatou-se também que esta família gênica é bastante extensa em soja, o que indica que tais genes participam de diversos processos biológicos nesta espécie, essenciais para sua sobrevivência, tal como proposto por STRACKE et al. (2001), que descreveram estes genes formando uma grande família gênica com cerca de 130 membros em *Arabidopsis thaliana*.

A árvore filogenética (Figura 5) permitiu verificar que o gene *MYBJ7* tem grande similaridade com o gene *MYB78*, também de soja, sendo que foram formados dois grupos principais, sendo que somente dois genes de soja, *MYB92* e *MYB185*, ficaram separados dos demais membros da família MYB de soja. Dentro do segundo e maior grupo, os genes *MYB* de soja se agruparam em um subgrupo de maior similaridade, comprovando a grande similaridade existente entre os membros desta família em soja.

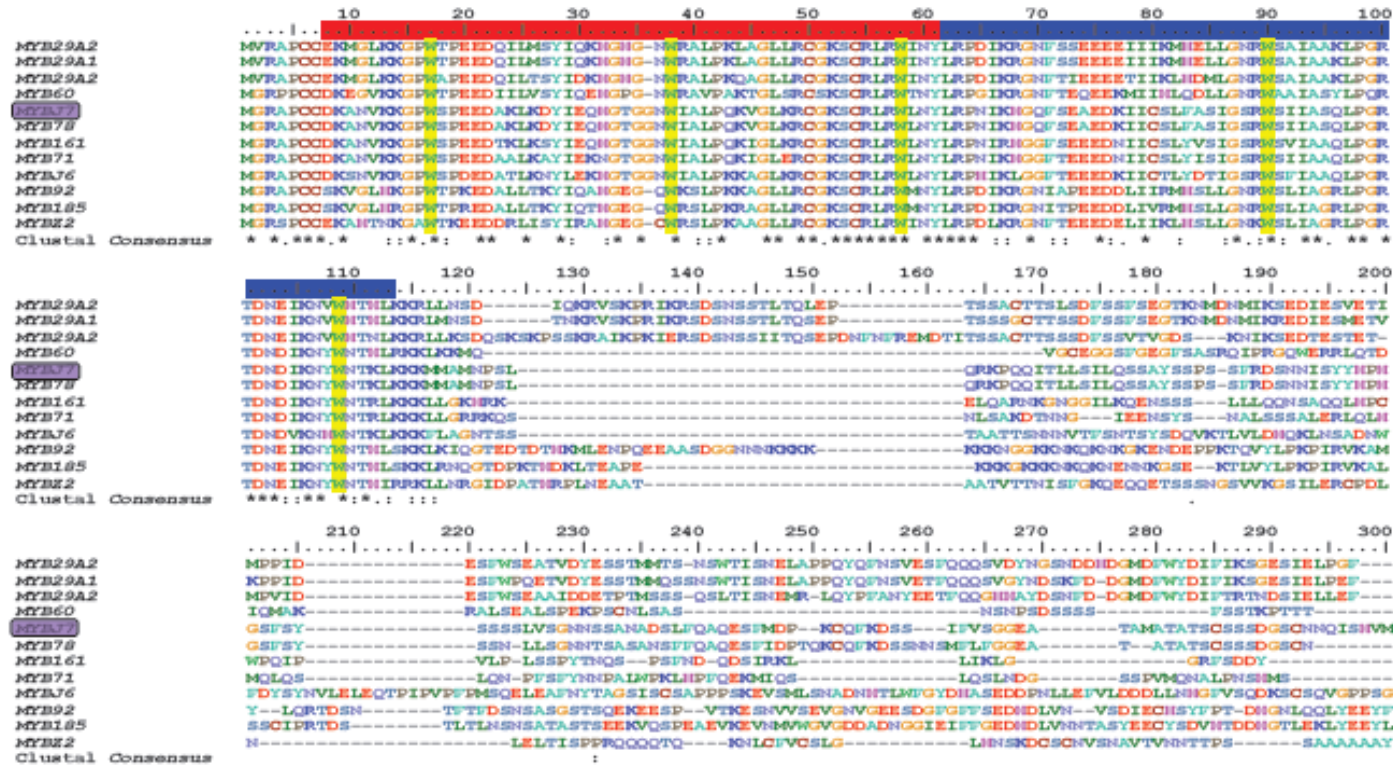


Figura 4 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificada pelo gene *MYBJ7* (nº de acesso: AB173973.1) de soja com membros da família MYB também de soja: *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81732.1); *MYB29A1* (nº de acesso: BAA81730.1); *MYB29A2* (nº de acesso: BAA81733.2); *MYB60* (nº de acesso: ABH02908.1); *MYB78* (nº de acesso: ABH02914.1); *MYB161* (nº de acesso: ABH02906.1); *MYB71* (nº de acesso: ABH02912.1); *MYBJ6* (nº de acesso: AB173972.1); *MYB92* (nº de acesso: ABH02844.1); *MYB185* (nº de acesso: ABH02841.1) e *MYBZ2* (nº de acesso: AB173970.1), realizado pelo programa ClustalX. * significa seqüências consensos. O domínio R2 está destacado com um traço vermelho, o domínio R3 com um traço azul e os triptofanos regularmente espaçados destacados em amarelo.

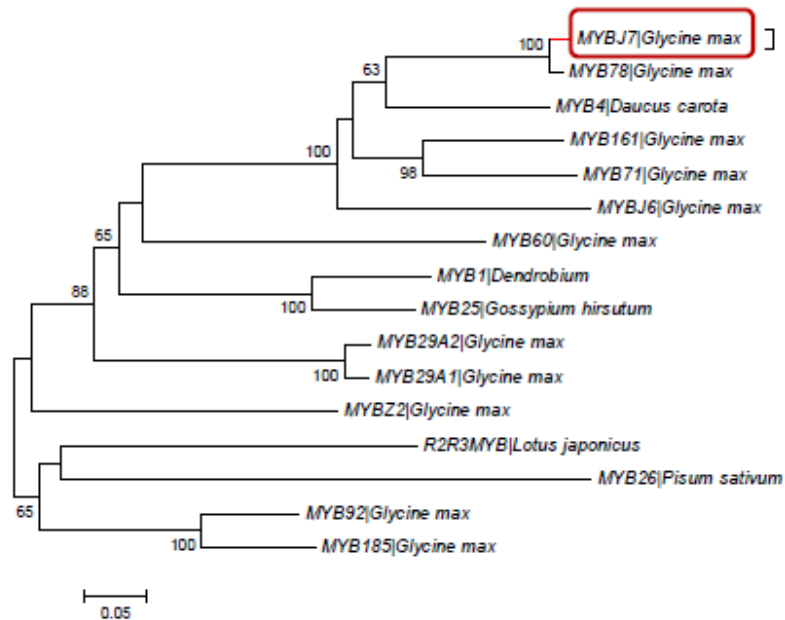


Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir de um alinhamento realizado com as seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes membros da família MYB de soja: MYBJ7 (n° de acesso: ABI73973.1) de soja com membros da família MYB também de soja: MYB29A2 (n° de acesso: BAA81732.1); MYB29A1 (n° de acesso: BAA81730.1); MYB29A2 (n° de acesso: BAA81733.2); MYB60 (n° de acesso: ABH02908.1); MYB78 (n° de acesso: ABH02914.1); MYB161 (n° de acesso: ABH02906.1); MYB71 (n° de acesso: ABH02912.1); MYBJ6 (n° de acesso: ABI73972.1); MYB92 (n° de acesso: ABH02844.1); MYB185 (n° de acesso: ABH02841.1) e MYBZ2 (n° de acesso: ABI73970.1) com *D. carota* (n° de acesso: BAF49444.1); *Dendrobium* sp. (n° de acesso: AF485892_1); *G. hirsutum* (n° de acesso: AF336283_1), *L. japonicus* (n° de acesso: BAG12895.1) e *P. sativum* (n° de acesso: CAA71992.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.

O gene *bZIP50* também teve sua seqüência predita de aminoácidos alinhada com seqüências de genes pertencentes à família bZIP em outras espécies vegetais (Figura 6), entretanto, como foi encontrada pouca similaridades entre as espécies utilizadas neste alinhamento, foi realizado também um alinhamento utilizando somente membros da família bZIP presentes apenas em soja (Figura 7), que possibilitou a localização do domínio conservado característico desta família e que caracteriza o gene *bZIP50* como pertencente a família de fatores de transcrição bZIP.

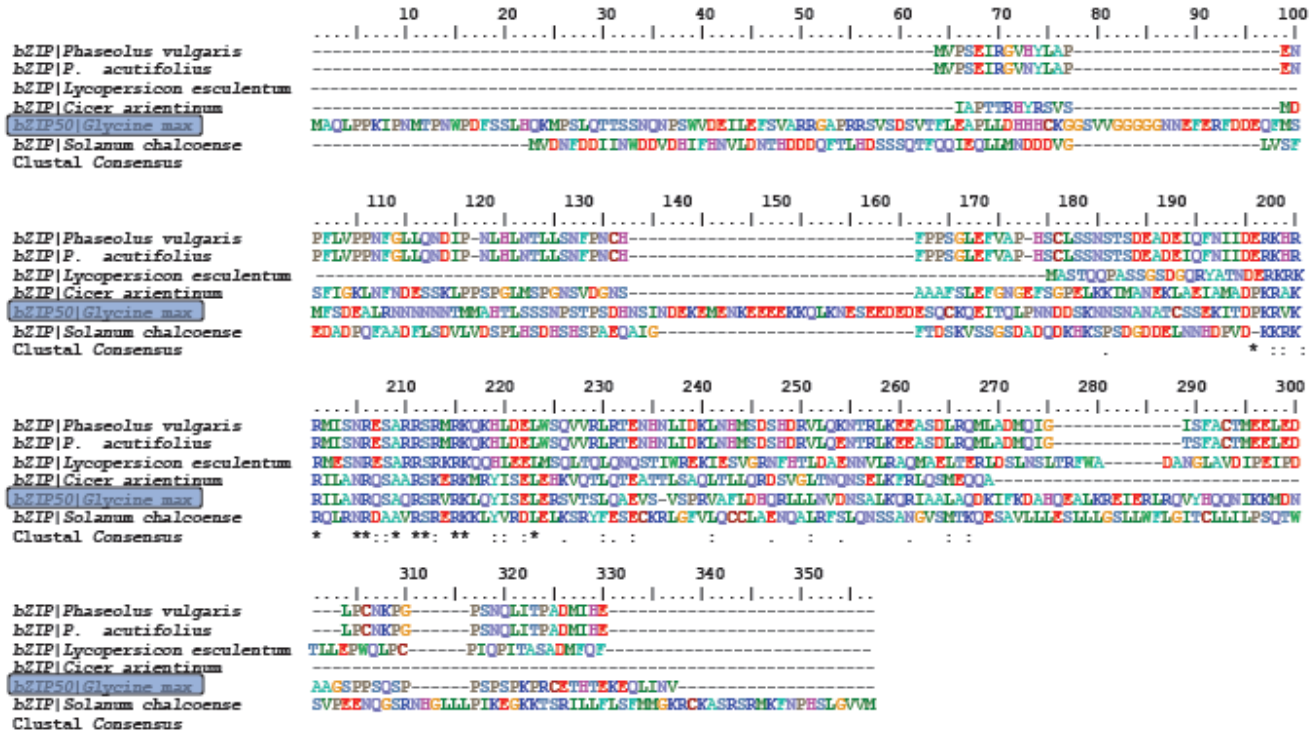


Figura 6 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *bZIP50* (nº de acesso ABI34644.1) de soja com outros membros da família bZIP em *Phaseolus vulgaris* (nº de acesso: AF350505_1); *P. acutifolius* (nº de acesso: AAK01953.1); *Cicer arietinum* (nº de acesso: BAA76425.1); *Lycopersicon sculentum* (nº de acesso: AAD55394.1); e *Solanum chacoense* (nº de acesso: ACB32232.1); realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consensos

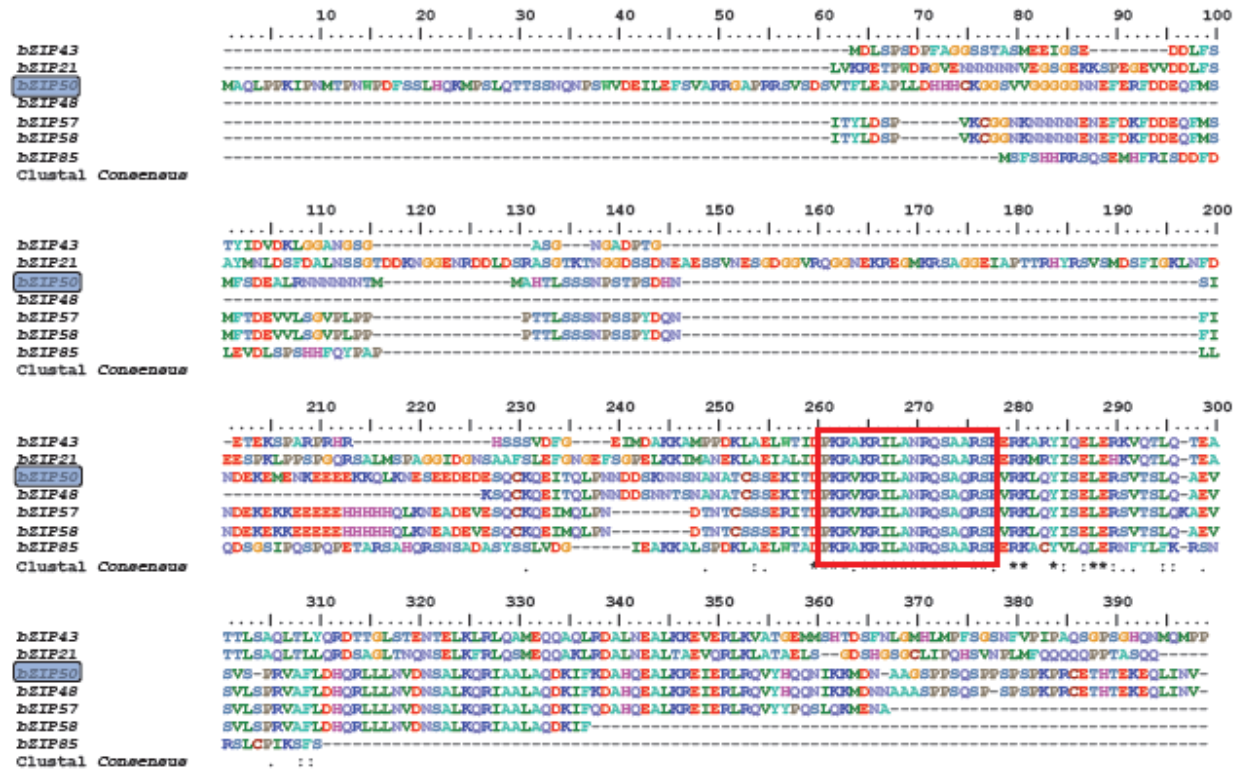


Figura 7 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos de membros da família bZIP de soja; *bZIP50* (n° de acesso: ABI34644.1); *bZIP43* (n° de acesso: ABI34685.1); *bZIP21* (n° de acesso: ABI34695.1); *bZIP48* (n° de acesso: ABP88222.1); *bZIP57* (n° de acesso: ABI34683.1); *bZIP58* (n° de acesso: ABP88224.1) e *bZIP85* (n° de acesso: ABP88224.1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consensos. O domínio bZIP está destacado em vermelho

Deste modo, pode se afirmar que o gene *bZIP50* pertence à uma família de fatores de transcrição bZIP, cuja principal característica é a presença de um domínio conservado com a mesma designação. Esse domínio apresenta uma região básica com aproximadamente 16 aminoácidos, caracterizado pela presença de um motivo invariável N-x₇-R/K, seguido de um zíper de leucinas, composto de sete repetições de leucinas ou outros *bulks* de aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Val, Phe ou Met). A região básica é responsável pela seqüência específica de ligação ao DNA e é altamente conservada. O zíper de leucina é uma seqüência anfipática de configuração enrolada, que confere especificidade de dimerização e, é pouco conservada (NIJHAWAN et al., 2008).

A formação do zíper de leucina permite a ligação ao DNA, de modo que as duas subunidades se aderem via interações entre os lados hidrofóbicos de suas hélices, criando uma estrutura com sobreposição super-helicoidizada. A habilidade de formar homo e heterodomínios é influenciada pela atração eletrostática e pela repulsão de resíduos polares que flanqueiam as interações hidrofóbicas na superfície das hélices (JAKOBY et al., 2002).

As proteínas bZIP de plantas se ligam preferencialmente á seqüências de DNA ACGT. A especificidade da ligação é regulada por nucleotídeos flanqueadores. De modo geral, os bZIPs vegetais ligam-se preferencialmente ao *A-box* (TACGTA), *C-box* (GACGTC) e *G-box* (CACGTG), mas existem também exemplos de ligações à regiões não palindrômicas (JAKOBY et al., 2002). Membros dessa família podem ainda interagir com elementos *cis* atuantes específicos de resposta ao ABA (ABRE) e ativar de maneira *trans* a expressão de genes *upstream* (ZOU et al., 2008).

Através da construção da árvore filogenética foi possível ratificar que genes pertencentes a família bZIP são muito distintos. Houve a formação de dois grandes grupos. Apesar dos genes de soja apresentarem o domínio conservado, metade dos genes utilizados no alinhamento se separaram em um grupo e a outra metade em outro, o que pode ser explicado pelo fato de apenas o domínio conservado característico da família é comum entre estes genes, sendo as demais regiões da seqüência muito díspares. O gene mais próximo ao *bZIP50* foi o *bZIP48* também de soja.

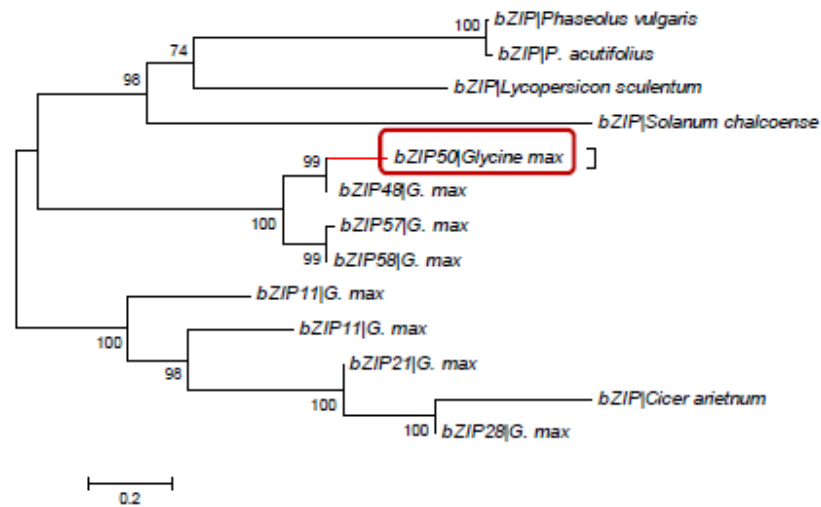


Figura 8 - Árvore filogenética construída a partir de um alinhamento realizado com seqüências gênicas presentes em membros da família bZIP de soja: *bZIP50* (nº de acesso: ABI34644.1); *bZIP43* (nº de acesso: ABI34685.1); *bZIP21* (nº de acesso: ABI34695.1); *bZIP48* (nº de acesso: ABP88222.1); *bZIP57* (nº de acesso: ABI34683.1); *bZIP58* (nº de acesso: ABP88224.1) e *bZIP85* (nº de acesso: ABP88224.1), com *P. vulgaris* (nº de acesso: AF350505_1); *P. acutifolius* (nº de acesso: AAK01953.1); *C. arietinum* (nº de acesso: BAA76425.1); *L. sculentum* (nº de acesso: AAD55394.1); e *S. chacoense* (nº de acesso: ACB32232.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*

Foi realizado ainda o alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificados pelo gene *C2H2* de soja com genes dessa família presentes em outros vegetais (Figura 9). Com a realização deste alinhamento foi possível constatar o gene *C2H2* pertence à família de fatores de transcrição C2H2, que são proteínas do tipo dedos de zinco (ZFPs - *zinc fingers proteins*) e constituem uma grande classe de fatores de transcrição, presentes em todos os eucariotos (ENGLBRECHT, 2004). Foi encontrado o domínio conservado específico de plantas QALGGH, tal qual o encontrado por AGARWAL (2007) em petúnias. Este motivo provavelmente encontra-se dentro de uma superfície de contato ao DNA, no motivo dedo de zinco (ZF - *zinc fingers*). O número de ZFs nessas proteínas varia de um a quatro, sendo que para o gene *C2H2* de soja aqui descrito, o número de ZFs é dois. De modo geral, o espaçamento entre os ZFs em proteínas que apresentam dois ZFs, varia entre 19 e 65

resíduos e, no caso de proteínas com 3 e 4 ZFs, as distâncias encontrados são de tamanhos mais curtos, entre 23 a 89 resíduos ou longos de 126 a 239 resíduos (AGARWAL, 2007).

Verificou-se ainda que os genes pertencentes a esta família são muito distintos entre si, tal qual descrito por AGARWAL et al. (2007), que realizaram uma análise aprofundada de 189 genes da família C2H2 - ZFP em arroz, mostrando que membros dessa família são extremamente diversos, podendo ser identificadas repetições em *tandem* de ZFs, assim como dispersos pela seqüência. Em *A. thaliana* também foi detectada muita variação entre os membros dessa família de fatores de transcrição (ENGLBRECHT et al., 2004).

As ZFPs do tipo C2H2 são caracterizadas pela presença de duas cisteínas e duas histidinas, no chamado domínio dedo de zinco, que estabiliza a estrutura tri-dimensional, consistindo de *2-stranded* antiparalelos */3-sheet* e uma a hélice circundando um zinco central (KAM et al., 2008).

Com base no alinhamento da Figura 9 e com outros membros da família C2H2 de soja, foi construída uma árvore filogenética (Figura 10). Foram formados dois grupos, sendo um maior e o outro onde apenas dois membros de soja se agruparam. Foi possível confirmar a disparidade existente nesta família, pois o gene *C2H2* de soja encontra-se mais próximo ao gene de *Brassica napus* que dos demais integrantes da família em soja.

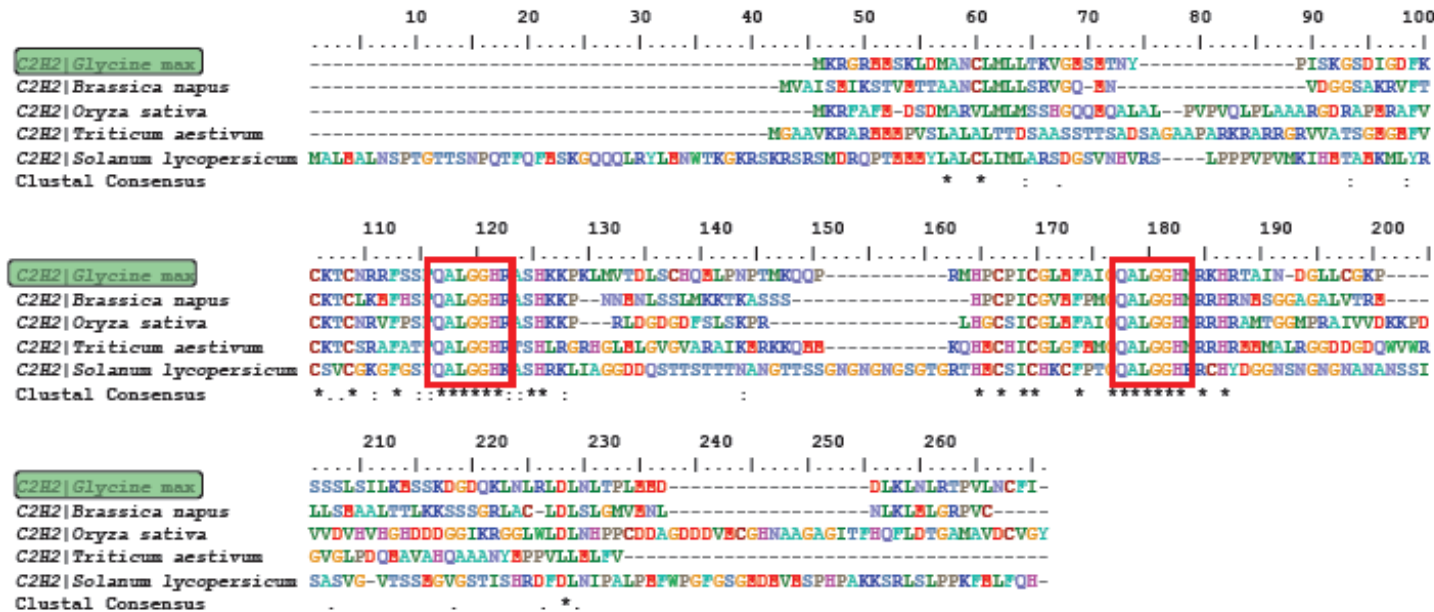


Figura 9 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *C2H2* (nº de acesso: ABQ53139.1) de soja com membros da família C2H2 encontradas em *Brassica napus* (nº de acesso: ABB52061.1), *Oryza sativa* (nº de acesso: AAP74357.1), *Triticum aestivum* (nº de acesso: ABZ80834.1) e *S. lycopersicum* (nº de acesso: ABR68563.1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX . O domínio conservado específico de plantas QALGGH está destacado em vermelho. * significa seqüências consensos

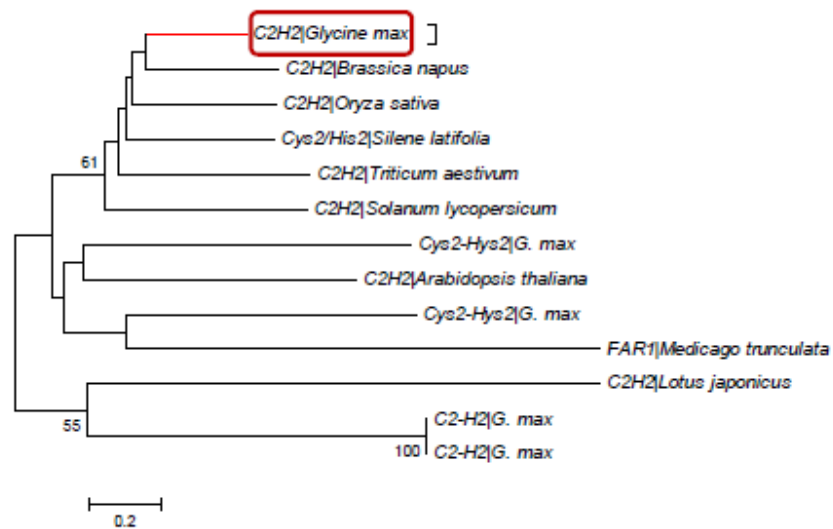


Figura 10 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes presentes em membros da família C2H2 de soja: C2H2 (nº de acesso: AAZ03389.1); C2H2 (nº de acesso: ABQ53139.1); CYS2-HIS2 (nº de acesso: CAK24965.1); C2-H2 (nº de acesso: ABX56674.1) e C2-H2 (nº de acesso: ACA24108.1); com *O. sativa* (nº de acesso: AAP74357.1); *A. thaliana* (nº de acesso: NP_180262.1); *B. napus* (nº de acesso: ABB52061.1); *T. aestivum* (nº de acesso: ABZ80834.1); *S. latifolia* (nº de acesso: AAY40248.1); *S. lycopersicum* (nº de acesso: ABR68563.1); *L. japonicus* (nº de acesso: BAG50062.1) e *M. trunculata* (nº de acesso: ABE91967.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*

Na Figura 11 é mostrado o alinhamento da seqüência predita de aminoácidos codificados pelo gene *NAC2* de soja, com seqüências de membros desta família de fatores de transcrição encontradas em outras plantas. Com este alinhamento foi possível constatar que o gene *NAC2* pertence à família NAC de fatores de transcrição, caracterizada por apresentar um domínio NAC, originalmente definido pela região N-terminal altamente conservada (GUO; GAN, 2006). A denominação NAC deriva do gene *NAM* (*NO APICAL MERISTEM* - sem meristema apical) de petúnia (*Petunia hybrida*) e dos genes de *A. thaliana* *ATAF1/ATAF2* e *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON2* - cotilédone em forma de taça) (ZHAO et al., 2008). Realizou-se então o alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos de membros da família NAC encontrados em soja (Figura 12), e verificou-se que esta família é muito conservada em soja.

Pelas suas características, o domínio NAC pode formar uma estrutura hélice-giro-hélice, de ligação a alvos específicos de DNA. A região C-terminal dessas proteínas é um provável domínio de ativação transcricional, apresentando alta divergência em sua seqüência (HE et al., 2005), como encontrado no alinhamento das seqüências (Figuras 11 e 12). Em petúncias, os genes *NAM* têm papel essencial na determinação dos meristemas e primórdios. Em *A. thaliana*, os genes *CUC1* e *CUC2* podem induzir a formação de meristemas apicais e a diferenciação de organismos florais (HE et al., 2005). Os genes da subfamília ATAF são induzidos por ataque de patógenos e por lesões (HU et al., 2008).

A árvore filogenética (Figura13) com o emprego do programa Mega 4.1, utilizando o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstraap*, partir da seqüência predita de aminoácidos codificados por membros da família NAC utilizados nos alinhamentos das Figuras 11 e 12. Houve a formação de um grande grupo onde os diversos membros da família NAC foram reunidos, exceto pelos genes *NAC5* que se isolaram, formando um pequeno grupo. Verificou-se ainda que o gene *NAC2* é bastante semelhante a outro gene *NAC2* de soja.

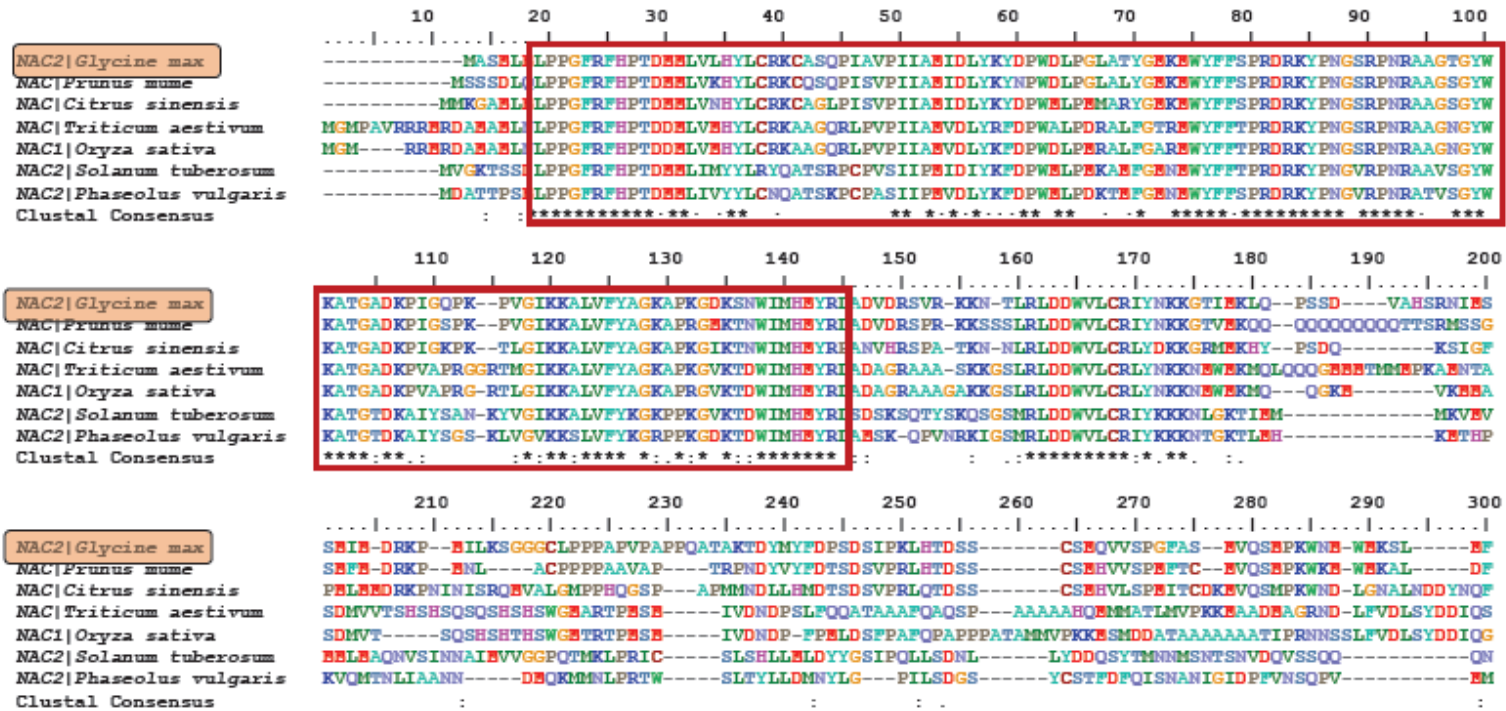


Figura 11 - Alinhamento da seqüência predita de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *NAC2* (nº de acesso: AAY46122.1) de soja com membros da família NAC presentes em *Prunus mume* (nº de acesso: BAE48667.1), *Citrus sinensis* (nº de acesso: ABQ96643.1), *Triticum aestivum* (nº de acesso: AAU08786.1), *O. sativa* (nº de acesso: ABD52007.1), *Solanum tuberosum* (nº de acesso: ABK96797.1) e *P. vulgaris* (nº de acesso: AF402603_1), realizado pelo programa de alinhamento ClustalX * significa seqüências consenso

Pelas suas características, o domínio NAC pode formar uma estrutura hélice-giro-hélice de ligação a alvos específicos de DNA. A região C-terminal dessas proteínas é um provável domínio de ativação transcricional, apresentando alta divergência em sua seqüência (HE et al., 2005), como encontrado no alinhamento das seqüências (Figuras 11 e 12). Em petúnias, os genes *NAM* têm papel essencial na determinação dos meristemas e primórdios. Em *A. thaliana*, os genes *CUC1* e *CUC2* podem induzir a formação de meristemas apicais e a diferenciação de organismos florais (HE et al., 2005). Os genes da subfamília ATAF são induzidos por ataque de patógenos e por lesões (HU et al., 2008).

Da análise da árvore filogenética (Figura 13), percebe-se a formação de um grande grupo onde os diversos membros da família NAC foram reunidos, exceto pelos genes *NAC5*, que se isolaram formando um pequeno grupo. Verificou-se ainda que o gene *NAC2* é idêntico à outra anotação do gene *NAC2* de soja, e semelhante ao gene NAC de *P. mume*.

Os alinhamentos das seqüências preditas dos aminoácidos codificados pelos fatores de transcrição *MYBJ7*, *bZIP50*, *C2H2* e *NAC2* possibilitou a identificação de regiões menos conservadas entre as seqüências, as quais foram utilizadas para o desenho dos *primers* para a quantificação dos níveis de expressão destes fatores por RT-qPCR. A elevada similaridade entre diferentes membros das famílias de tais fatores de transcrição em soja poderia levar à ocorrência de amplificações inespecíficas, de outros membros das famílias.

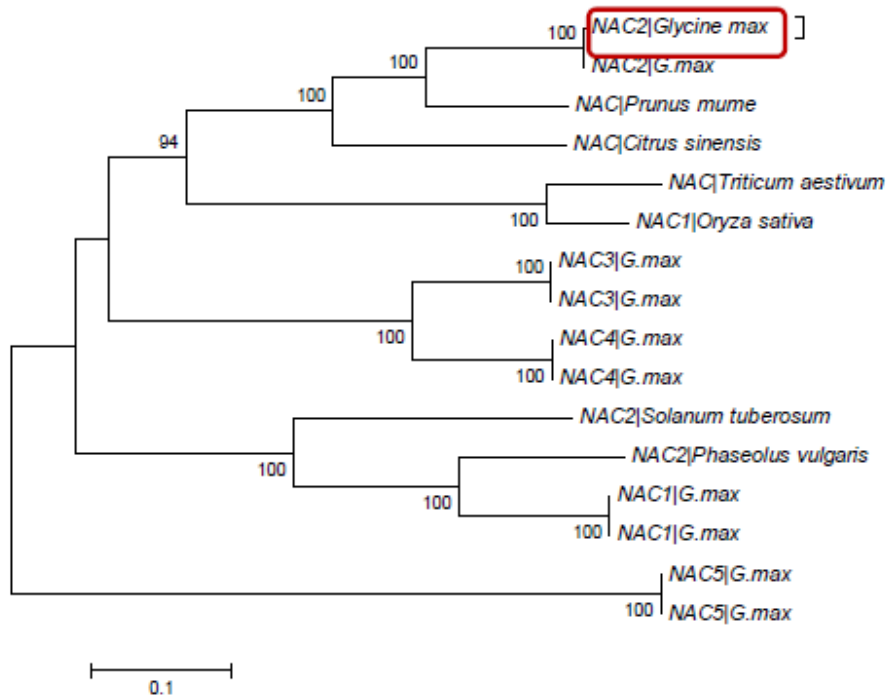


Figura 13 - Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de seqüências preditas de aminoácidos codificados por genes membros da família NAC de soja: *NAC2* (nº de acesso; AAY46122.1); *NAC2* (nº de acesso; AAX85979.1); *NAC1* (nº de acesso; AAY46121.1); *NAC1* (nº de acesso; AAX85978.1); *NAC3* (nº de acesso; AAY46123.1); *NAC3* (nº de acesso; AAX85980.1); *NAC4* (nº de acesso; AAX85981.1); *NAC4* (nº de acesso; AAY46124.1); *NAC5* (nº de acesso; AAY46125.1); *NAC5* (nº de acesso; AAX85982.1); *P. mume* (nº de acesso; BAE48667.1); *C. sinensis* (nº de acesso; ABQ96643.1); *T. aestivum* (nº de acesso; AAU08786.1); *P. vulgaris* (nº de acesso; AF402603_1); *O. sativa* (nº de acesso; ABD52007.1) e *S. tuberosum* (nº de acesso; ABK96797.1), utilizando o programa Mega 4.1, com o método *Neighbor Joining* e o teste de confiabilidade *Bootstrap*.

Análise dos genes diferencialmente expressos em soja durante a condição de seca, por RT-qPCR

O gene *MYBJ7* apresentou, na cultivar tolerante Conquista no tratamento de 25 min de estresse, maior expressão gênica quando comparado com os demais tratamentos nesta cultivar, o que indica que esse gene pode estar atuando em vias iniciais de resposta ao déficit hídrico. Na cultivar sensível BR16 a expressão desse

gene também foi detectada a 25 min de estresse, porém, o maior pico foi detectado no tempo de 75 min de desidratação (Figura 14).

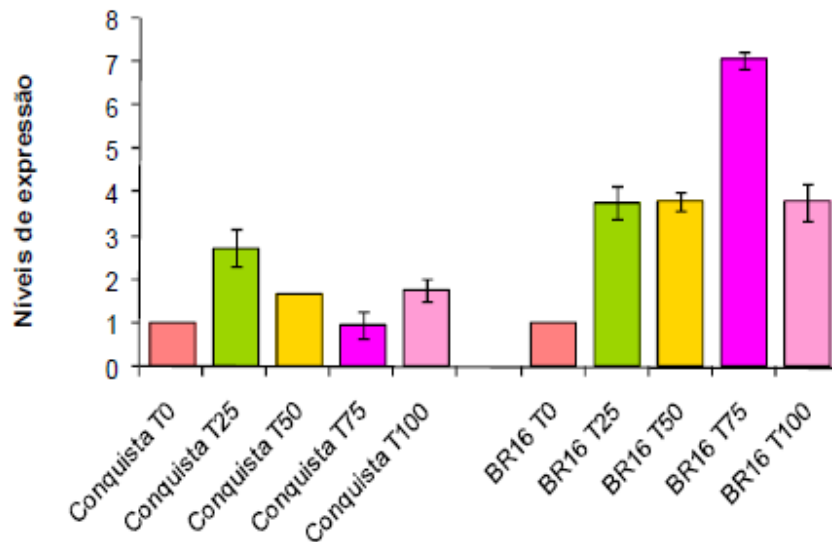


Figura 14 - Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *MYBJ7*, em raízes das cultivares de soja, tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.

O maior nível de expressão detectado na cultivar sensível em relação a cultivar tolerante indica que este gene esteja participando de vias de regulação negativa da expressão de genes que poderiam proporcionar respostas importantes no processo de tolerância ao estresse hídrico. Na literatura científica, alguns genes da família MYB são inferidos como participantes de vias regulação negativa.

Fornale et al, (2006), trabalhando com milho, aludiram que os genes *ZmMYB31* e *ZmMYB42*, quando superexpressos atuam atenuando a expressão de genes relacionados ao processo de síntese de lignina. O gene *MYBJ7*, como integrante da família de fatores de transcrição MYB, pode atuar de modo semelhante aos que ocorrem com os genes *ZmMYB31* e *ZmMYB42* de arroz, ou seja, inibindo a expressão de genes cuja a expressão possa desfavorecer a tolerância à seca.

Diversos trabalhos relacionam o acúmulo de lignina na parede celular com a diminuição do crescimento radicular (ANDRADE, 2006; FAN et al.; 2006; SANTOS et al., 2008), o que não seria uma resposta desejada para as cultivares de soja aqui estudadas, visto que o aprofundamento do sistema radicial constitui um importante mecanismo utilizado por plantas sob deficiência hídrica. Por outro lado, Yoshimura et al. (2008), ao analisarem proteínas oriundas de raízes de melancia, que haviam sido submetidas a diferentes tempos de desidratação, verificaram que proteínas relacionadas com a síntese de ligninas são expressas após o decorrer de maiores tempos de desidratação. Estes autores propuseram que as ligninas sintetizadas nas raízes durante este período atuam através do aumento da força mecânica dos tecidos radiculares possibilitando o enraizamento em camadas secas do solo. O perfil apresentando pelo gene *MYBJ7* nas raízes da cultivar tolerante (Conquista) sugere que o mesmo possa estar viabilizando a indução de proteínas relacionadas com a síntese de ligninas a partir do tempo 50 min, onde houve redução dos níveis de expressão deste gene.

Cominelli et al. (2008), trabalhando com *A. thaliana* sugeriram que o gene *AtMYB41*, outro membro da família MYB, pode ter um papel direto ou indireto na regulação negativa dos genes *AtEXP5* e *AtEXPIO* que codificam expansinas, proteínas capazes de induzir a expansão celular, participando do processo de crescimento de raízes sob estresse hídrico e de folhas sob estresse salino (VESELOV et al., 2008; CHO; COSGROVE, 2002). Experimentos com foco em raízes sob condições de seca têm apontado as expansinas como participantes ativas no processo de crescimento radicular durante a seca em milho (SHARP et al 2004; POROYKO et al., 2007; ZHU et al., 2007; SPOLLEN et al., 2008), sendo que estas têm sido ainda relacionados ao processo de iniciação de pelos radiculares em cevada (KWASNIEWSKI; SZAREJKO, 2006). Deste modo, pode se aludir que o menor nível de expressão encontrado na cultivar tolerante (Conquista) em relação a cultivar sensível (BR16) possa estar ocorrendo para que não seja acionado o mecanismo de regulação negativa das expansinas, pois as mesmas estão relacionadas a respostas essenciais das raízes quando submetidas a seca.

Por outro lado, outros papéis são ainda atribuídos as proteínas MYB, por exemplo o envolvimento na via biosintética de fenilpropanóides, o controle da especialização da morfologia das células, a regulação das respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos, hormônios e luz (COMINELLI et al., 2008), participando ainda do controle da biossíntese de flavonóides (STRACKE et al., 2007). Diversos trabalhos relatam os genes da família MYB como fatores de transcrição que possuem elementos de resposta ao ABA, estando diretamente ligados a respostas das plantas a estresses abióticos, como a seca, uma vez que nas plantas a maioria dos genes estudados induzidos por seca são também induzidos por ABA. No entanto, vários trabalhos têm descrito genes que são induzidos por desidratação, mas que não são induzidos por ABA, sugerindo a existência de duas cascatas de transdução de sinal, uma independente e outra dependente de ABA (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

A família MYB é uma das principais famílias de fatores de transcrição envolvidos na ativação gênica dependente de ABA (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). Estudos têm demonstrado que o ABA provê o crescimento da raiz via supressão do acúmulo do etileno e contribui para a condutividade hidráulica, aumentando a atividade das aquaporinas, proteínas transportadoras de água localizadas nas membranas celulares (SHARP, 2002). Sugere-se que o gene *MYBJ7*, cuja expressão gênica foi aumentada nas raízes de soja, em ambas as cultivares, tolerante (Conquista - embora apenas no tempo 25 min) e sensível (BR16), submetidas a estresse hídrico, pode estar envolvido nesta via de resposta ao estresse hídrico mediado por ABA.

DAÍ et al. (2007) trabalhando com *A. thaliana*, demonstraram que plantas transformadas superexpressando o gene *OsMYB3R* isolado de arroz apresentaram maior tolerância à seca, frio e salinidade. Em outro trabalho, Reyes e Chua (2007) verificaram que os fatores de transcrição MYB estão ainda envolvidos no processo de germinação de sementes em *A. thaliana*, submetidas a estresses abióticos. Também em *Arabidopsis*, foi detectado que plantas que tiveram um aumento da expressão dos genes *AtMYB2* e/ou *AtMYC2*, demonstraram hipersensibilidade significativa ao ABA, tanto em tecidos vegetativos quanto em sementes, indicando que

esses genes funcionam como ativadores transcricionais de rotas metabólicas que atuam nas respostas vegetais à seca (ABE et al., 2003), como já discutido anteriormente.

Jung et al. (2008), quando superexpressaram o gene *AtMYB44* em *A. thaliana*, obtiveram plantas mais tolerantes à seca e à salinidade, através principalmente do mecanismo de resposta dos estômatos, sendo que foi encontrada expressão deste gene tanto em folhas quanto em raízes.

Sugere-se que o gene *MYBJ7*, que apresentou em raízes de soja níveis de expressão mais elevados em condições de estresse em comparação ao controle, esteja participando de resposta semelhante à descrita por JUNG e colaboradores, entretanto, tal afirmação não pode ser feita visto os níveis de expressão deste gene só foram avaliados em raízes. Presume-se a ligação das raízes com o fechamento dos estômatos por seca seja pelo fato de que para que haja o fechamento deve existir dependência de sinais hidráulicos (potencial de água na folha e o turgor celular) e/ou sinais químicos (hormônio ácido abscísico - ABA) (KALEFETOGLU; EKMEKÇI, 2005). Como o ABA sintetizado nas raízes sob condições de seca pode também ser transportado para a célula guarda, induzindo o fechamento estomático (HOLBROOK et al., 2002), e como já mencionado, o gene *MYBJ7* é induzido por ABA, e foi expresso nas raízes de soja sujeitas a deficiência hídrica, é sugerido que este esteja ligado ao processo de fechamento estomático, tal qual o gene *AtMYB41*.

O perfil de expressão apresentado pelo gene *NAC2* foi muito semelhante para as duas cultivares, tolerante (Conquista) e sensível (BR16) (Figura 15), indicando aumento da expressão gênica com o decorrer dos tratamentos de desidratação, culminando com o maior pico de expressão no tratamento 100 min.

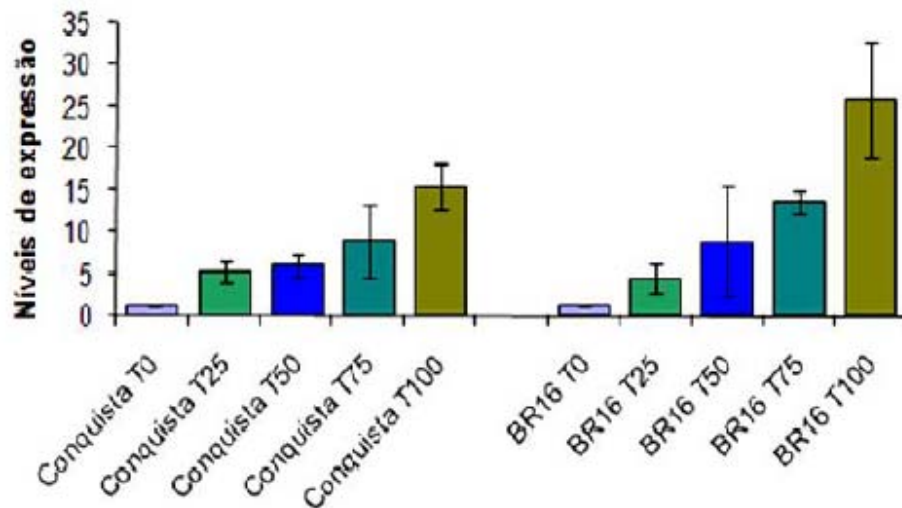


Figura 15 - Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *NAC2* em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.

Genes da família de fatores de transcrição NAC são expressos em vários tecidos vegetais (NAKASHIMA et al., 2007) e, em diferentes estágios de desenvolvimento, como no desenvolvimento embrionário, vegetativo e floral, (OLSEN et al., 2005), senescência foliar (GUO; GAN, 2006) e ainda em respostas a estresses bióticos e abióticos (NAKASHIMA et al., 2007).

TRAN et al. (2004) mostraram que em *A. thaliana* transgênica, superexpressando três genes da família NAC (*ANAC19*, *ANAC055* e *ANAC072*), houve um aumento significativo na tolerância das plantas à seca. HE et al. (2005), também trabalhando com *A. thaliana*, propuseram que o gene *AtNAC2* pode ser ativado por etileno, auxina e ABA, culminando na formação de raízes laterais, em resposta ao estresse salino. A ação desses três hormônios poderia também ser sugerida para o gene *NAC2* alvo deste estudo no tempo 100 min de desidratação (onde foi detectado o maior pico de expressão), todavia, não foram aferidos os níveis hormonais nas cultivares aqui analisadas.

Em trabalho de HU et al. (2006), ao utilizar a construção *35S/SNAC1* em arroz, obtiveram plantas com expressão ampliada deste gene induzido por seca e salinidade. O aumento dos níveis de expressão foi detectado sobretudo em células guarda, indicando um possível papel deste fator de transcrição no aumento do fechamento estomático em resposta a estes estresses abióticos. Todavia níveis de expressão desse gene foram detectados também nas raízes destas plantas, tal qual detectado neste estudo.

Embora os perfis de expressão dos fatores de transcrição *NAC2* e *MYBJ7* (Figuras 14 e 15), tenham sido discrepantes, ambos tiveram aumento nos níveis de expressão quando submetidas à deficiência hídrica nas raízes de soja das cultivares aqui estudadas. HE e colaboradores também detectaram aumento nos níveis de expressão de genes membros das famílias MYB e NAC, e inferem a existência de interação entre os membros destas famílias gênicas no processo de fechamento estomático, o que corrobora com o proposto por JUNG et al. (2008).

HU et al. (2008) superexpressaram o gene *SNAC2* em arroz utilizando o promotor constitutivo 35S, e constataram que esse gene é intensamente induzido em raízes e moderadamente induzido em folhas e internódulos por estresse de seca, salinidade e frio. A forte indução de *NAC2* em raízes detectada no presente estudo, tal qual obtido por HU e colaboradores, indica a importância desse gene em respostas primárias do vegetal aos estresses abióticos como a seca, uma vez que as primeiras mudanças metabólicas de resposta a deficiência hídrica ocorrem nas raízes, primeiro órgão da planta afetado pelo estresse e responsável pela detecção e distribuição do sinal para todo o vegetal, que imediatamente aciona mecanismos responsivos (KAVAR et al., 2008). Genes desta família também foram identificados por Montiel et al. (2004) como participantes na formação de raízes laterais, especialmente *NAC1*.

Nakashima et al., (2007) trabalhando com arroz superexpressando o gene *OsNAC6*, membro da família NAC, encontraram 33 genes induzidos por desidratação que tiveram aumento nos níveis de expressão. Dentre esses genes foram encontrados fatores de transcrição contendo o domínio MYB, o que corrobora com a teoria de He et al. (2005), que propõe a existência de interação entre membros das famílias NAC e MYB em respostas vegetais à estresses abióticos. Foram encontrados

ainda fatores de transcrição contendo o domínio dedos de zinco, domínio contido no gene *C2H2*, que teve os níveis de expressão aumentados no presente estudo, o que sugere que possa existir uma ligação entre fatores de transcrição que apresentam o domínio NAC com os que apresentam o domínio dedos de zinco nas respostas das plantas submetidas à desidratação. Foram encontrados ainda genes que codificam proteínas com funções preditas de tolerância ao estresse como as proteínas de ação detoxificante, antioxidante e de degradação, evidenciando o papel desse gene em diversas vias de resposta vegetal à seca.

O gene *bZIP50* apresentou expressão gênica maior nos tempos de 50 min, 75 min e 100 min de desidratação, sendo que na cultivar tolerante (Conquista), no tratamento 75 min, foi identificado o maior pico de expressão. Na cultivar sensível (BR16), também foi verificada expressão gênica diferencial, a partir dos 50 min de estresse (Figura 16). O perfil de expressão apresentado pelo gene *bZIP50* mostrou-se análogo ao obtido por STOLF (2007) para o gene *LEA14*, entretanto, os valores obtidos para *LEA14* foram mais elevados que os encontrados para *bZIP50*, o que pode indicar que este encontra-se ativando a expressão do gene *LEA14*. A presumida ligação entre genes da família bZIP com as proteínas LEA tem sido descrita na literatura científica.

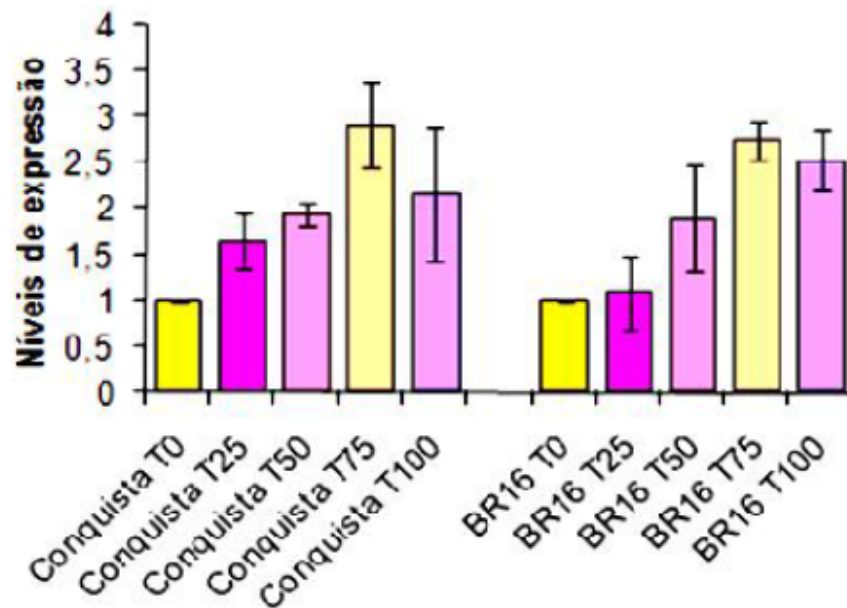


Figura 16 - Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *bZIP50* em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e, sensível BR16, submetidas aos tratamentos de estresse de hídrico: 0 min (controle sem estresse), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.

Kobayashi et al. (2008) ao introduzir o gene *WLIP19*, um tipo de bZIP oriundo do trigo, constataram que este atua ativando a expressão do gene *COR/LEA*, culminado na obtenção de plantas de trigo mais tolerantes ao frio.

A atuação de fatores de transcrição da família bZIP como ativadores da expressão de genes que codificam proteínas LEA denota uma importante resposta da planta a estresses abióticos como a seca, uma vez que as proteínas LEA englobam uma importante classe que desempenha papéis fundamentais na proteção das plantas submetidas a estresses, em processos essenciais para a sobrevivência vegetal. Tais proteínas são tipicamente hidrofílicas, fortemente ligadas à retenção de água, para prevenir a cristalização de importantes proteínas celulares e outras moléculas durante a dessecação. Elas podem agir ainda como chaperonas moleculares, na manutenção da estrutura de outras proteínas em vegetais submetidos à estresses abióticos, como a seca (BABU et al., 2004; ROYCHOUDHURY et al., 2007).

O gene *bZIP50* poderia ainda estar participando da via de resposta para aumento da biomassa das raízes, de acordo com Rodriguez-Uribe e Oconnell (2006), que, trabalhando com raízes de *Phaseolus acutifolius* e *P. vulgaris*, sugeriram que fatores de transcrição do tipo bZIP poderiam estar participando no processo de alongação de raízes, para adaptação da planta a seca.

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando-se como alvo genes da família bZIP, no que se refere a respostas das plantas a estresses abióticos, principalmente pelo fato de que estes fatores apresentam uma seqüência conservada ABRE (elemento de resposta ao ácido abscísico) (UNO et al., 2000). De modo geral, esta seqüência gênica funciona como um elemento *cis* atuantes do DNA, e está envolvida na regulação da expressão de genes mediados por ABA. Este hormônio vegetal exerce papel importante na adaptação dos tecidos vegetativos a estresses abióticos como a seca, promovendo o fechamento dos estômatos nas células guarda, mediando o efluxo de solutos e regulando a expressão de muitos outros genes que tem funções na tolerância à desidratação, tanto em tecidos vegetativos quanto em sementes (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Os resultados de expressão gênica de bZIP demonstram aumento nos níveis de expressão da cultivar tolerante Conquista já no tempo 25 min, diferindo da cultivar sensível BR16, onde houve diferença apenas entre controle e tratamento de desidratação após 50 min de estresse, ou seja, a expressão na cultivar sensível BR16 foi mais tardia, indicando que esse pode ser um importante mecanismo de tolerância da soja a períodos mais prolongados de seca. Em trabalho realizado por Nijhawan et al.,(2008), membros da família bZIP de *A. thaliana* foram caracterizados e constatou-se que alguns membros desta família de fatores de transcrição podem apresentar níveis de expressão aumentados, enquanto outros tem sua expressão diminuída por seca, salinidade ou frio.

O gene *C2H2*, na cultivar tolerante Conquista, apresentou um aumento significativo da expressão gênica no tratamento de estresse de tempo 25 min de desidratação, diminuindo no transcórre dos demais tempos de tratamentos (Figura 17). Na cultivar sensível BR16, um aumento da expressão gênica ocorreu já a partir do tratamento de tempo 25 min de desidratação, porém, em níveis bem menores que os

apresentados por Conquista, aumentando aos 50 min, diminuindo aos 75 min e atingindo valor máximo em 100 min de desidratação. Logo, o pico de expressão gênica na cultivar sensível foi mais tardio em relação a cultivar tolerante. Esse resultado indica que este gene pode atuar nas respostas iniciais de adaptação das raízes de soja à seca, sendo que, na cultivar tolerante Conquista, a maior expressão no início do estresse hídrico já seria suficiente para desencadear as respostas necessárias, enquanto que, na cultivar sensível BR16, o estímulo para indução das respostas seria requerido durante todo o período de estresse.

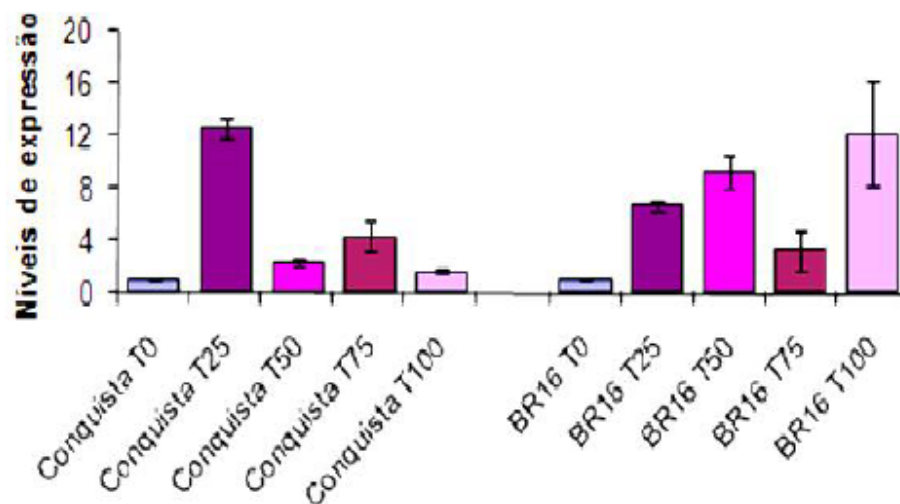


Figura 17 - Níveis de expressão gênica relativa, obtidos por RT-qPCR, do gene *C2H2* em raízes das cultivares de soja tolerante Conquista e BR16 sensível, submetidas aos tempos de tratamentos de estresse hídrico: 0 min (controle), 25 min, 50 min, 75 min e 100 min de desidratação. Os traços verticais entre as barras correspondem ao erro padrão.

Os fatores de transcrição C2H2 (Cisteína²/Histidina²) ou *zinc fingers proteins* (ZFPs) constituem uma larga família de fatores de transcrição em eucariontes (ENGLBRETCHT et al., 2004; et al., 2007) e, em plantas, eles estão envolvidos em vários processos vegetais, tais como, regulação da organogênese floral, iniciação da folha, iniciação das raízes laterais, gametogênese e respostas a estresses (ENGLBRETCHT et al., 2004).

Em trabalho realizado por Kam et al., (2008) também utilizando a técnica de RT - qPCR para verificar níveis de expressão de genes da família C2H2 em trigo, foi encontrado que membros desta família são mais expressos em raízes que outras partes da planta, o que é uma importante resposta, visto que as raízes desempenham papel essencial na adaptação da planta ao estresse de seca e estão envolvidas na percepção da planta à seca e passagem desse sinal para as partes aéreas. Diante destes resultados, foi proposto que essa família pode constituir um importante grupo de fatores de transcrição, envolvidos na modulação das respostas das raízes de trigo ao déficit hídrico, sendo que o mesmo poderia ser aplicado às raízes das cultivares de soja analisadas neste estudo, que tiveram níveis de expressão elevados em resposta à desidratação. Entretanto, a afirmação de que os níveis de expressão apresentaram-se maiores em raízes em relação aos demais órgãos da planta não pode ser feita, uma vez que, apenas nas raízes o nível de expressão gênica foi quantificado.

Ciftci-Yilmaz et al., (2007) também verificaram que a expressão do gene *ZAT7*, membro da família C2H2 em *A. thaliana*, apresentou maior expressão em raízes quando comparado com outras partes da planta. Entretanto, mesmo diante de vários trabalhos relatando possíveis funções biológicas desencadeadas por esta família, os mecanismos nos quais esses fatores de transcrição atuam ainda não foram elucidados, especialmente quanto às respostas vegetais à seca e outros estresses abióticos (SAKAMOTO et al., 2004; XU et al., 2007; CIFTICI-YILMAZ et al., 2007; KAM et al., 2008)

De modo geral, os resultados obtidos por RT-qPCR para o gene desta família confirmaram os resultados obtidos com a técnica de microarranjos de cDNA (Tabela 1), uma vez que, todos os fatores de transcrição *MIBJ7*, *bZIP50*, *C2H2* e *NAC2*, aqui estudados, apresentaram níveis de expressão diferencial em raízes de soja submetidas ao déficit hídrico em pelo menos um dos tempos de tratamento de desidratação. Porém, como pode ser observado nas figuras 14, 15, 16 e 17, os níveis de expressão foram diferentes para todos os genes. Tais diferenças são advindas da maior sensibilidade da técnica de RT - qPCR, em relação à técnica de microarranjos de cDNA, na quantificação da expressão gênica (KUBISTA et al., 2006).

Tabela 1 - Genes diferencialmente expressos identificados em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de microarranjos de cDNA STOLF, (2007). T1 = *bulk* de 25 min + 50 min de estresse; T2 = *bulk* de 75 min + 100 min de estresse hídrico, induzido por desidratação.

Cultivar-tempo	ID gene	Similaridade	Expressão	Evalue
Conquista-T1	BRSOGMSC1050E07.b	GO:0003700-bZIP50 (G. max)	1,81	7 e-31
	BRSOGMSC1046C01.b	GO:0003700-MYBJ7 (G. max)	1,59	0,017
Conquista-T2	BRSOGMSC1059A04.b	GO:0003700-dedo de zinco C2H2 (G. max)	4,37	4 e-29
BR16 T2	BRSOGMSC1050E02.b	GO:0003700-Proteína NAC2 (G. max)	1,52	3 e-44

CONCLUSÕES

No presente estudo foram realizados alinhamentos das seqüências preditas de aminoácidos codificadas pelos fatores de transcrição *MYBJ7*, *NAC2*, *bZIP50* e *C2H2* encontradas em soja com seqüências preditas de aminoácidos codificados por membros das famílias gênicas presentes em outros vegetais. Nesta comparação foram identificadas as seqüências conservadas que caracterizam estes genes como pertencentes às respectivas famílias MYB, NAC, bZIP e C2H2. Verificou-se ainda que estas famílias são muito extensas e que estão presentes em diversas espécies vegetais. Com a construção da árvore filogenética para cada um dos genes foi possível verificar que em alguns casos os genes que apresentam maior homologia com os genes de soja alvos deste estudo estão presentes em outras espécies vegetais.

Com a utilização da técnica de RT-qPCR foram quantificados os níveis de expressão dos fatores de transcrição *MYBJ7*, *NAC2*, *bZIP50* e *C2H2*. Os altos níveis de expressão para os genes *NAC2* e *MYBJ7* sob a presença de estresse hídrico quantificados neste estudo ratifica os resultados publicados em trabalhos anteriores na literatura científica, com a análise da expressão de genes em ensaios com estresses abióticos. Alguns trabalhos sugerem uma associação destes dois fatores de transcrição em processos de respostas a estresses abióticos, sendo que os dois apresentam aumento nos níveis de expressão durante os tratamentos, tal qual ocorrido neste estudo.

Em diversos ensaios descritos na literatura, genes da família bZIP têm sido sugeridos como participantes de distintas vias de respostas a estresses. A expressão do gene *bZIP50*, em raízes de soja submetidas à desidratação no presente estudo vem ratificar o papel deste gene em respostas vegetais a estresses abióticos. Um dos possíveis papéis de genes da família bZIP como ativador de genes da família LEA pode ser confirmado neste estudo.

O gene *C2H2* teve um perfil de expressão muito peculiar, visto que apresentou expressão maior na cultivar tolerante já no início do tratamento, bem mais cedo que na cultivar sensível, sugerindo que o mesmo participa de processos iniciais de resposta da planta à desidratação. Além disso, o aumento nos níveis de expressão deste gene nas raízes de soja aqui estudadas corroboram com os resultados obtidos em trabalhos anteriores, onde este gene vem sendo associado com respostas de raízes a estresses abióticos.

Grande parte dos trabalhos desenvolvidos outrora utilizando genes pertencentes às famílias MYB, NAC, bZIP e C2H2 das quais fazem parte os fatores de transcrição *MYBJ7*, *NAC2*, *bZIP50* e *C2H2* respectivamente, foram realizados com a utilização de plantas modelo como *A. thaliana* e tabaco, entretanto no presente estudo foi utilizada a soja, planta com grande importância econômica. Com a exposição das raízes das duas cultivares de soja uma tolerante (Conquista) e a outra sensível (BR16) a diversos tempos de desidratação foi constatado que estes genes apresentam expressão diferencial, sendo que seus níveis de expressão são acentuados durante os tratamentos aplicados, confirmando que os mesmos participam das vias metabólicas de resposta vegetal à seca, sendo que as respostas diferem de acordo com a cultivar estudada e com a severidade dos tratamentos aplicados.

O estudo destes fatores de transcrição em raízes de soja das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16 ao déficit hídrico, contribuirá para futuros avanços no entendimento das rotas metabólicas que atuam nas respostas da soja à seca.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AEN-PR - Agência Estadual de Notícias - Disponível em: <www.agenciadenoticias.pr.gov.br>. Acesso em: jul. 2007.
- AGARWAL, P.; ARORA, R.; RAY, S.; SINGH, A. K.; SINGH, V. P.; TAKATSUJI, H.; KAPOOR, S.; TYAGI, A. K. Genome-wide identification of *C2H2* zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. **Plant Mol. Biol.**, v. 65, p. 467 - 485, 2007.
- ANDRADE, A. B. **Inibição do crescimento de raízes de soja pela mimosina:lignificação e enzimas relacionadas**. Tese - Universidade Estadual de Maringá, 2006.
- APROSSUL - Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso do Sul. Perdas na safra de soja chegam a R\$ 189 milhões. **Tribuna Popular** - O Jornal da Cidade. Disponível em: <www.tribunapopularnews.com.br>. Acesso em: jul. 2007.
- BABU, R. C.; ZHANG, J.; BLUMC, A.; HO, T.-H. D; WU, R.; NGUYENF, H. T. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Sci.**, v. 166, p. 855 - 862, 2004.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Jour. Mol. End.**, v. 25, p. 169 -193, 2000.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Func. Plant Biol.**, v. 30, p. 239 - 264, 2003.
- CHEN, B.-J.; WANG, Y.; HU, Y.-L.; WU, Q.; LIN, Z.-P. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*. **Plant Sci.**, v. 168, p. 493 - 500, 2005.
- CHEN, W. J.; ZHU, T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. **Trends Plant Sci.**, v. 9, p. 591 - 596, 2004.
- CHO, H-T; COSGROVE, D. J. Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in Arabidopsis. **Plan Cell**, v. 14, p. 3237 - 3253, 2002.
- CHRISPEELS, H. E.; OCTTINGER, H.; JANVIER, N.; TAGUE, B. W. *AtZFPI*, encoding *Arabidopsis thaliana C2H2* zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p. 279 - 290, 2000.

- CIFTCI-YILMAZ, S.; MORSY, M. R.; SONG, L.; COUTU, A.; KRIZEK, B. A.; LEWIS, M. W.; WARREN, D.; CUSHMAN, J.; CONNOLY, E. L.; MITTLER, R. The EAR-motif of the Cys2/Hys2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. **Jour. Biol. Chem.**, v. 282, p. 9260 - 9268, 2007.
- COMINELLI, E.; SALA, T.; CALVI, D.; GUSMAROLI, G.; TONELLI, C. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. **Plant Jour.**, v. 53, p.53 - 64. 2008.
- DAÍ, X.; XU, Y.; MA, Q.; XU, W.; WANG, T.; XUE, Y.; CHONG, K. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance o freezing, drought and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v.143, p. 1739 - 1751, 2007.
- DAVLETOVA, S.; SCHLAUCH, K.; COUTU, J.; MITTLER, R. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v. 139, p. 847 - 856, 2005.
- ENGLBRECHT, C. C.; SCHOOF, H.; BÖHM, S. Conservation, diversification and expansion of C₂H₂ zinc finger protein in the *Arabidopsis thaliana* genome. **BMC Gen.** Acesso em: <<http://www.biomedcentral.com.br/1471-2164/5739>. 2004>.
- FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stelar Accumulation of Wall Phenolics. **Plant Phys.**, v. 140, p. 603 - 612, 2006.
- FORNALE, S.; SONBOL, F. M.; MAES, T.; CAPELLADES, M.; PUIGDOMENECH, P.; RIGAU, J.; CAPARROS-RUIZ, D. Down-regulation of the maize and *Arabidopsis thaliana* caffeic acid Omethyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. **Plant Mol. Biol.**, v. 62, p. 809 -823, 2006.
- GAO, J-P.; CHAO, D-Y.; LIN, H-X. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress responses in rice. **Jour. Int. Plan Biol.**, v. 49, p. 742-750, 2007.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hem.**, v. 30, p. 503 - 512, 2002.
- GUO, Y.; GAN, S. *AtNAP*, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. **Plant Jour.**, v. 46, p. 601 - 612, 2006.
- 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. **Plant Jour.**, v. 44, p. 903 - 916, 2005.
- HEGEDUS, D.; YU, M.; BALDWIN, D.; GRUBER, M.; SHARPER, A.; PARKIN, I.; WHITWILL, S.; LYDIATE, D. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain

transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. **Plant Mol. Biol.**, v. 53, p. 383 - 397, 2003.

HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: STEWART, F. C. **Plant Phys. Aca. Press**, New York, 1963. p. 97-134.

HOLBROOK, N. M.; SHASHIDHAR, V. R.; JAMES, R. A.; MUNNS, R. Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: responses of grafted plants to soil drying. **Journ. Exp. Bot.**, v. 53, p. 1503 - 1514, 2002.

HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcriptional factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Mol. Biol.**, v. 67, p. 169 - 181, 2008.

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **PNAS**, v. 103, p. 12987 - 12992, 2006.

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DROGE - LASER, W.; CARBAJOSA, J. V.; TIEDEMAN, J.; KROJ, T. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci.**, v. 7, p. 106 - 111, 2002.

JUNG, C.; SEO, J. S.; HAN, S. W.; KOO, Y. J.; KIM, C. H.; SANG, I. K.; SONG, S. I.; NAHM, B. H.; CHOI Y. D.; CHEONG, J.-J. Overexpression of At MYB 44 Enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v. 146, p. 623 - 635, 2008.

KALEFETOGLU, T.; EKMEKQY, Y. The Effects of Drought on Plants And Tolerance Mechanisms (Review). **Jour. Sci.**, v. 18, n. 4, p. 723-740, 2005.

KAM, J.; GRESSHOFF, P. M.; SHORTER, R.; XUE, G.-P. The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress. **Plant Mol. Biol.**, p. 67, v. 305 - 322, 2008.

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the responses of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol. Breed.**, v. 21, p. 159 - 172, 2008.

KOBAYASHI, F.; MAETA, E.; TERASHIMA, A.; KAWAURA, K.; OGIHARA, Y.; TAKUMI, S. Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat. **Jour. Exp. Bot.**, v. 59, p. 891-905, 2008.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÄK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBAK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. Review- The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Mol. Asp. Med.**, v. 27, p. 95-125, 2006.

- KWASNIEWSKI, M.; SZAREJKO, I. Molecular Cloning and Characterization of b-Expansin Gene Related to Root Hair Formation in Barley. **Plant Phys.** v. 141, p. 1149 - 1158, 2006.
- MENG, Q.; ZHANG, C.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Jour. Phys.**, v.164, p. 1002 - 1012, 2007.
- MITSUUYA, Y.; TAKAHASHI, Y.; UEHARA, Y.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; TAKAHASHI, H.; KUSANO, T. Identification of a novel Cys2/Hys2-type zincfinger protein as a component of a spermine-signaling pathway in tobacco. **Jour. Plant Phys.**, v. 164, p. 785 - 793, 2007.
- MONTIEL, G.; GANTET, P.; JAY-ALLEMAND, C.; BRETON, C. Transcription factor networks, pathways to the knowledge of root development. **Plant Phys.**, v. 136, p. 3478 - 3485, 2004.
- NAKASHIMA, K.; TRAN, L.-S. P.; NGUYEN, D. V.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; TOKADA, D.; ITO, Y.; HAYASHI, N.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. **Plant Jour.**, v. 51, p. 617 - 630, 2007.
- NIJHAWAN, A.; JAIN, M.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. **Plant Phys.**, v. 146, p. 333 - 350, 2008.
- NIEVA, C.; BUSK, P. K.; DOMINGUEZ-PUIGJANER, E.; LUMBRERAS, V.; TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M.-C.; PAGES, M. Isolation and functional characterization of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*. **Plant Mol. Biol.**, v. 58, p. 899 - 914, 2005.
- OLSEN, A. N.; ERNST, H.; LEGGIO, L. L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Sci.**, v. 10, p. 79 - 87, 2005.
- 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 Prod. Sci.**, v. 7, p. 129 - 137, 2004.
- PABO, C. O.; PEISACH, E.; GRANT, R. A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. **Annu. Rev. Bioch.**, v. 70, p. 313 - 340, 2001. QU, L. J.; ZHU, Y. X. Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, p.1 - 6, 2006.
- REYES, J. L.; CHUA, N-H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **Plant Jour.**, v. 49, p. 592 - 606, 2007.

- RODRIGUEZ - URIBE, L.; O'CONELI, M. A. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and comun bean (*P. vulgaris*). **Jour. Exp. Bot.**, v. 57, p. 1391 - 1398, 2006.
- ROYCHOUDHURY, A.; ROY, C.; SENGUPTA, D. N. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 1839 - 1859, 2007.
- SAKAMOTO, H.; MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; MESHII, T.; IWABUCHI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. **Plant Phys.**, v. 136, p. 2734 - 2746, 2004.
- SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. V.; MOURÃO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. **Jour. Chem. Ecol.**, DOI 10.1007/s10886-008-9522-3, 2008.
- SCHIERMEIER, Q. The costs of global warming. **Nature**, v. 439, p.374 - 375, 2006.
- SCHUSTER, I; VIEIRA E. S. N.; SANTANA, H.; SINHORATI, D.; SILVA, R. B.; OLIVEIRA, M. A. R. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. **Pesq. Agro. Bras.**, v. 42, p. 515 - 520, 2007.
- 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 pro/Eles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Jour.**, v. 31 p. 279 - 292, 2002.
- 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.
- SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT H. J.; NGUYEN, H. T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Jour. Exp.Bot.**, v. 55, p. 23432351, 2004.
- SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant Cell Env.**, v. 25, p. 211 -2 22, 2002.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 221 - 227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 3, p. 217 - 223, 2000.

SPOLEEN, W. G.; TAO, W.; VALLIYODAN, B.; CHEN, K.; HEJLEK, L. G.; KIM, J.-J.; LENOBLE, M. E.; ZHU1, J.; BOHNERT, H. J.; HENDERSON, D.; SCHACHTMAN, D. P.; DAVIS, G. E.; SPRINGER, G. K.; SHARP, R. E. NGUYEN, H. T. Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential **BMC Plant Biol.**, doi:10.1186/1471-2229-8-32, 2008.

STOKSTAD, E. States sue over global warming. **Sci.**, v. 305, p. 590, 2004.

STOLF, R. **Identificação e análise da expressão de genes relacionados com a tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real** Tese - Unesp - Campos Jaboticabal, 2007.

STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Jour.**, v. 50, p. 660 - 677, 2007.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 447 - 456, 2001.

SURALTA, R. R.; YAMAUCHI, A. Root growth, aerenchyma development, and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. **Env. Exp. Bot.**, doi:10.1016/j.envexpbot.2008.01.004, 2008.

TALAMÈ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 229 - 240, 2007.

TORRES, G. A. M.; PFLIEGER, S.; CORRE-MENGUY, F.; MAZUBERT, C.; HARTMANN, C.; LELANDAIS-BRIE'RE, C. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. **Plant Sci.**, v. 171, p. 300 - 307, 2006.

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.

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

VESELOV, D. S.; SABIRZHANOVA, I. B.; SABIRZHANOV B. E.; CHEMERIS A. V. Changes in Expansin Gene Expression, IAA Content, and Extension Growth of Leaf Cells in Maize Plants Subjected to Salinity. **Russ. J Plant Physl.** 2008.

XU, S.; WANG, X.; CHEN, J. Zinc finger protein 1 (ThZFI) from salt cress (*Thellungiella halophila*) is a Cys-2/Hys-2-type transcription factor involved in drought and salt stress. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 497 - 506, 2007.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 781 - 803, 2006.

YANHUI, C.; XIAOYUAN, Y.; KUN, H.; MEIHUA, L.; JIGANG, LI.; ZHAOFENG, G.; ZHIQIANG, L.; YUNFEI, Z.; XIAOXIAO, W.; XIAOMING, Q.; YUNPING, S.; LI, Z.; XIAOHUI, D.; JINGCHU, L.; XING-WANG, D.; ZHANGLIANG, C.; HONGYA, G.; LI-JIA, Q. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Mol. Biol.**, v. 60, p. 107 - 124, 2006.

YOSHIMURA, K.; MASUDA, A.; KUWANO, M.; YOKOTA, A.; AKASHI, K. Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. **Plant Cell Phys.**, v. 49, p. 226 - 241, 2008.

ZHAO, C.; AVCI, U.; GRANT, E. H.; HAIGLER, C. H.; BEERS, E. P. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. **Plant Jour.**, v. 53, p. 425 - 436, 2008.

ZHU, J.; ALVAREZ, S.; MARSH, E. L.; LENOBLE, M. E.; CHO, I.-J.; SIVAGURU, M. CHEN, S.; NGUYEN, H. T.; WU, Y.; SCHACHTMAN, D. T.; SHARP, R. E. Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. II. Region-Specific Changes in Water Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins under Water Deficit^{1[WJ][OA]}. **Pant Phys.**, v. 145, p. 1533 - 1548, 2007

ZOU, M.; GUAN, Y.; REN, H.; ZHANG, F.; CHEN, F. A bZIP transcription factor, OsAB15, is involved in rice fertility and stress tolerance. **Plant Mol. Biol.**, v. 66, p. 675 - 683, 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fatores de transcrição *MYBJ7*, *NAC2* *bZIP60* e *C2H2* que aqui tiveram seus níveis de expressão gênica quantificados foram previamente identificados em trabalho utilizando a técnica de microarranjos de cDNA, sendo que a categoria fatores de transcrição foi selecionada devido a sua importância na modulação da expressão gênica.

Os alinhamentos das seqüências preditas de aminoácidos codificados pelos fatores de transcrição aqui analisados possibilitaram que se encontrassem as seqüências conservadas características de cada família gênica. A construção das árvores filogenéticas possibilitou a análise das diferenças evolutivas existentes entre os membros destas famílias gênicas, mostrando que em alguns casos, os genes encontrados em soja se assemelham mais com os genes presentes em outras espécies. Os alinhamentos e as árvores filogenéticas viabilizaram a discussão dos resultados obtidos para os genes alvo deste estudo, de acordo com o comportamento de membros destas famílias de fatores de transcrição encontrados em outras espécies vegetais previamente utilizadas por outros pesquisadores em ensaios para a análise de respostas moleculares das plantas a estresses abióticos.

Todos os fatores de transcrição aqui analisados apresentaram aumentos nos níveis de expressão quando submetidos aos tratamentos de desidratação, entretanto, apresentaram perfis de expressão diferenciados entre si. O aumento dos níveis de expressão destes genes em raízes de soja submetidas à desidratação pressupõe que tal qual sugerido em estudos anteriores, membros destas famílias gênicas atuam em respostas vegetais à seca.

Neste contexto, um passo futuro para este estudo será o uso de técnicas moleculares como a construção de cassetes de superexpressão ou de silenciamento gênico com o intuito de se averiguar em quais vias metabólicas estes genes atuam na soja submetida à deficiência hídrica, e futuramente, a obtenção de cultivares mais tolerantes a condições prolongadas de seca.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AEN-PR - Agência Estadual de Notícias. Disponível em: <www.agenciadenoticias.pr.gov.br>. Acesso em: jul. 2007.
- AGARWAL, P.; ARORA, R.; RAY, S.; SINGH, A. K.; SINGH, V. P.; TAKATSUJI, H.; KAPOOR, S.; TYAGI, A. K. Genome-wide identification of *C2H2* zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. **Plant Mol. Biol.**, v. 65, p. 467 - 485, 2007.
- AMBION. Disponível em: <www.ambion.com>. Acesso em: 18 ago. 2007.
- ANDRADE, A. B. **Inibição do crescimento de raízes de soja pela mimosina:lignificação e enzimas relacionadas**. Tese - (Universidade Estadual de Maringá), 2006.
- APROSSUL - Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso do Sul. Perdas na safra de soja chegam a R\$ 189 milhões. **Tribuna Popular** - O Jornal da Cidade. Disponível em: <www.tribunapopularnews.com.br>. Acesso em julho de 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 Sci.**, v. 167, p. 1359 - 1365, 2004.
- BABU, R. C.; ZHANG, J.; BLUMC, A.; HO, T.-H. D; WU, R.; NGUYENF, H. T. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Sci.**, v. 166, p. 855 - 862, 2004.
- BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v. 15, p.4-7, 2000.
- BENEVENTI, M. A. **Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *rd29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. Dissertação - Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- BIES-ETHÈVE, N.; GAUBIER-COMELLA, P.; DEBURES, A.; LASSERRE, E.; JOBET, E.; RAYNAL, M.; COOKE, R.; DELSENY, M. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, v. 67, p. 107 - 124. 2008.

- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Jour. Exp. Bot.**, v. 55, p. 2331 - 2341, 2004.
- BROUN, P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 202 - 209, 2004.
- BRUNNER, A. M.; YAKOVLEV, I. A.; STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biol.**, v. 4, p. 10 - 14, 2004.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. **Jour. Mol. End.**, v. 34, p. 597 - 601, 2005.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Jour. Mol. End.**, v. 29, p. 23 - 39, 2002.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Jour. Mol. End.**, v. 25, p. 169 - 193, 2000.
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Jour. Exp. Bot.**, v. 55, p. 2365 - 2384, 2004.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Func. Plant Biol.**, v. 30, p. 239 - 264, 2003.
- CHEN, M.; WANG, Q.-Y.; CHENG, X.-G.; XU, Z.-S.; LI, L.-C.; YE, X.-G.; XIA, L.-Q.; MA, Y.-Z. *GmDREB*, a soybean DRE-binding transcription factor conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Bioch. Bioph. Res. Com.**, v. 353, p. 299 - 305, 2007.
- CHEN, B.-J.; WANG, Y.; HU, Y.-L.; WU, Q.; LIN, Z.-P. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*. **Plant Sci.**, v. 168, p. 493 - 500, 2005.
- CHEN, W. J.; ZHU, T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. **Trends Plant Sci.**, v. 9, p. 591 - 596, 2004.
- CHO, H-T; COSGROVE, D. J. Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*. **Plan Cell**, v. 14, p. 3237 - 3253, 2002.
- CIFTCI-YILMAZ, S.; MORSY, M. R.; SONG, L.; COUTU, A.; KRIZEK, B. A.; LEWIS, M. W.; WARREN, D.; CUSHMAN, J.; CONNOLLY, E. L.; MITTLER, R. The EAR-motif of the Cys2/Hys2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. **Jour. Biol. Chem.**, v. 282, p. 9260 - 9268, 2007.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias, **Mol. Bioch. Paras.**, v. 156, p. 96 - 101, 2007.

COMINELLI, E.; SALA, T.; CALVI, D.; GUSMAROLI, G.; TONELLI, C. Overexpression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. **Plant Jour.**, v. 53, p. 53 - 64. 2008.

CONAB. **Indicadores da agropecuária**: outubro de 2007. Brasília: CONAB/DIGEM/SUINF/GEINT, v. 16, n. 10, 2007. 64 p.

CHRISPEELS, H. E.; OCTTINGER, H.; JANVIER, N.; TAGUE, B. W. *AtZFPI*, encoding *Arabidopsis thaliana C2H2* zinc-finger protein 1, is expressed downstream of photomorphogenic activation. **Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 279 -290, 2000.

DAÍ, X.; XU, Y.; MA, Q.; XU, W.; WANG, T.; XUE, Y.; CHONG, K. Overexpression of an R1R2R3 *MYB* gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance o freezing, drought and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v. 143, p. 1739 - 1751, 2007.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. **Circular técnica 43**. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

DOMIT, L. A.; PÍPOLO, A. E.; MIRANDA, L. C. GUIMARÃES, M. F. Transferência de tecnologia para cultivares de soja desenvolvidas pela Embrapa Soja para o Paraná. **Rev. Bras. Sem.**, v. 29, p.1 - 9, 2007.

EMBRAPA SOJA. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em: jan. 2008.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil - 2007**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006.

ENGLBRECHT, C. C.; SCHOOF, H.; BÖHM, S. Conservation, diversification and expansion of C2H2zinc finger protein in the *Arabidopsis thaliana* genome. **BMC Genomics**. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com.br/1471-2164/5/39>. 2004>.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stelar Accumulation of Wall Phenolics. **Plant Phys.**, v. 140, p. 603 - 612, 2006.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Circular técnica 48**. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

FARNY, N. G.; HURT, J. A.; SILVER, P. A. Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. **Gen. Dev.**, v. 22, p. 66 - 78, 2008.

FENG, J.-X.; LIU, D.; PAN, Y.; GONG, W.; MA, L.-G.; LUO, J.-C.; DENG, X. W.; ZHU, Y.-X. An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP transcription factor gene family. **Plant Mol. Biol.**, v. 59, p. 853 - 868, 2005.

FERREIRA, N. C. V. **Análise, classificação, anotação e perfil de expressão de fatores de transcrição no endosperma de milho (*Zea mays* L.)**. Tese - UNICAMP, 2006.

FORNALE, S.; SONBOL, F. M.; MAES, T.; CAPELLADES, M.; PUIGDOMENECH, P.; RIGAU, J.; CAPARROS-RUIZ, D. Down-regulation of the maize and Arabidopsis thaliana caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. **Plant Mol. Biol.**, v. 62, p. 809 - 823, 2006.

GAO, J-P.; CHAO, D-Y.; LIN, H-X. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress responses in rice. **Jour. Int. Plan Biol.**, v. 49, p. 742-750, 2007.

GABUT, M.; CHAUDHRY, S.; BLENCOWE, B. J. SnapShot: the splicing regulatory machinery. **Cell**, v. 133, p. 4, 2008.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp. Hem.**, v. 30, p. 503 - 512, 2002.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VACKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methos.**, v. 25, p. 386 - 401, 2001.

GONG, W.; SHEN, Y. P.; MA, L. G.; PAN, Y.; DU, Y. L.; WANG, D. H.; YANG, J. Y.; HU, L. D.; LIU, X. F.; DONG, C. X.; MA, L.; CHEN, Y. - H.; YANG, X. - Y.; GAO, Y.; ZHU, D.; TAN, X.; MU, J. - Y.; ZHANG, D. - B.; LIU, Y. - L.; DINESH-KUMAR, S. P.; LI, Y., WANG, X. - P.; GU, H. - Y.; QU, L. - J.; BAI, S. - N.; LU, Y. - T.; LI, J. - Y.; ZHAO, J. - D.; ZUO, J.; HUANG, H.; DENG, X. W.; ZHU, Y. -X. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. **Plant Phys.**, v. 135, p. 773 - 782, 2004.

GORANTLA, M.; BABU, P. R.; REDDY LACHAGARI, V. B.; REDDY, A. M. M. WUSIRIKA, R.; BENNETZEN, J. L.; REDDY, A. R. Identification of stress responsive genes in an indica rice (*Oriza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 253 - 265, 2007.

GUO, Y.; GAN, S. *AtNAP*, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. **Plant Jour.**, v. 46, p. 601 - 612, 2006.

HAUTBERGUE, G. M.; HUNG, M.-L.; GOLOVANOV, A. P.; LIAN, L.-Y.; WILSON, S. A. Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP. **PNAS**, v. 105, p. 5154 - 5159, 2008.

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. **Plant Jour.**, v. 44, p. 903 - 916, 2005.

- HEWITT, E. J. Mineral nutrition of plants in culture media. In: Stewart, F. C. **Plant Phys. Aca. Press**, New York, p. 97-134, 1963.
- HIROTA, A.; KATO, T.; FUKAKI, H.; AIDA, M.; TASAKA, M. The Auxin-Regulated AP2/EREBP Gene PUCHI Is Required for Morphogenesis in the Early Lateral Root Primordium of Arabidopsis^w. **Plant Cell.**, v. 19, p. 2156 -2168, 2007.
- HONG-BO, S., ZONG-SUO, L., MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Col. Surf. Bioi.**, v. 45, p. 131-5, 2005.
- HOLBROOK N. M.; SHASHIDHAR V. R.; JAMES R. A.; MUNNS R. Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. **Jour. Exper. Bot.**, v. 53, p. 1503 - 1514, 2002.
- HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcriptional factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Mol. Biol.**, v. 67, p. 169 - 181, 2008.
- HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **PNAS**, v. 103, p. 12987 - 12992, 2006.
- HUANG, B.; JIN, L.; LIU, J. - Y. Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE - binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). **Jour. Plant Phys.**, v. 165, p. 214 - 223, 2008.
- HUANG, B.; GAO, H. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. **Crop Sci.**, v. 40, p. 196 - 203, 2000.
- INGRAN, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants . Annu. Rev. Plant. Physiol. **Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 377 - 403, 1996.
- ISKEN, O.; MAQUAT, L. E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. **Genes Dev.**, v. 21, p. 1833 - 3856 2007.
- JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DROGE - LASER, W.; CARBAJOSA, J. V.; TIEDEMAN, J.; KROJ, T. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci.**, v. 7, p. 106 - 111, 2002.
- JUNG, C.; SEO, J. S.; HAN, S. W.; KOO, Y. J.; KIM, C. H.; SANG, I. K.; SONG, S. I.; NAHM, B. H.; CHOI Y. D.; CHEONG, J.-J. Overexpression of At MYB 44 Enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Phys.**, v. 146, p. 623 - 635, 2008.
- KALEFETOGLU, T.; EKMEKCY, Y. The Effects of Drought on Plants And Tolerance Mechanisms (Review). **Jour. Sci.**, v. 18, n. 4, p. 723-740, 2005.

- KALEMBA, E. M., PUKACKA, S. Changes in late embryogenesis abundant proteins and a small heat shock protein during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Env. Exp. Bot.**, v. 73, p. 274 - 280, 2008.
- KAM, J.; GRESSHOFF, P. M.; SHORTER, R.; XUE, G.-P. The Q-type C2H2 zinc finger subfamily of transcription factors in *Triticum aestivum* is predominantly expressed in roots and enriched with members containing an EAR repressor motif and responsive to drought stress. **Plant Mol. Biol.**, p. 67, v. 305 - 322, 2008.
- KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, S.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol. Breed.**, v. 21, p. 159-172. 2008.
- KARABA, A.; DIXIT, S.; GRECO, R.; AHARONI, A.; TRIJATMIKO, K. R.; MARSCHMARTINEZ, N.; KRISHNAN, A.; NATARAJA, K. N.; UDAYAKUMAR, M.; PEREIRA, A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. **PNAS**, v. 104, p. 15270 - 15275, 2007.
- KARIM, S.; ARONSSON, H.; ERICSON, H.; PIRHONEN, M.; LEYMAN, B.; WELIN, B.; MANTYLA, E.; PALVA, T.; DIJCK, P. V.; HOLMSTRON, K.-O. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. **Plant Mol. Biol.**, v. 64, p. 371 - 386, 2007.
- 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 Phys.**, v. 45, n. 3, p.346-350, 2004.
- KATHIRESAN, A.; LAFITTE, H. R.; CHEN, J.; MANSUETO, L.; BRUSKIEWICH, R.; BENNETT, J. Gene expression microarrays and their application in drought stress research. **Field Crops Res.**, v. 97, p. 101 - 110, 2006.
- KATO, T.; MORITA, M. T.; FUKAKI, H.; YAMAUCHI, Y.; UEHARA, M.; NIIHAMA, M.; TASAKA, M. SGR2, a Phospholipase-Like Protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are Involved in the Shoot Gravitropism of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 14, p. 33 - 46, 2002.
- KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the responses of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol. Breed.**, v. 21, p. 159 - 172, 2008.
- KIM, S. Y. The role of ABF family bZIP class transcription factors stress response. **Phys. Plant**, v. 126, p. 519 - 527, 2006.
- KOBAYASHI, F.; MAETA, E.; TERASHIMA, A.; KAWAURA, K.; OGIHARA, Y.; TAKUMI, S. Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat. **Jour. Exp. Bot.**, v. 59, p. 891-905, 2008.

- KOMILI, S.; SILVER, P. A. Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. **Nat. Rev. Gen.**, v. 9, p. 38 - 48, 2008.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBAK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. Review- The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Mol. Asp. Med.**, v. 27, p. 95 - 125, 2006.
- 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.
- KWASNIEWSKI, M.; SZAREJKO, I. Molecular Cloning and Characterization of b-Expansin Gene Related to Root Hair Formation in Barley. **Plant Phys.** v. 141, p. 1149 - 1158, 2006.
- LEE, S. - B.; KWON, H. - B.; KWON, S. - J.; PARK, S.- C.; JEONG, M. - J.; HAN, S. - E.; BYUN, M. - O.; DANIELL, H. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. **Mol. Breed.**, v. 11, p. 1 - 3. 2003.
- LEE, T.I.; YOUNG, R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. **Annual Rev. Genet.**, v. 34, p. 77 - 137, 2000.
- LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. **Cell**, v. 128, p. 707 - 719, 2007.
- LIN, C. J.; BARBOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arq. Bras. Endoc. Metab.**, v. 46, p. 330 - 340, 2002.
- MAHAJAN, S.; TUJETA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Sci. Dir.**, v. 444, p. 139 - 158, 2005.
- MALAMY, J. E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. **Plant Cell Env.**, v. 28, p. 67 - 77, 2005.
- MANIVANNAN, P.; JALEEL, C. A.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. **C. R. Biol.** p.331, v. 418 - 425, 2008.
- MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; LOHAR, D. P.; SHAROPOVA, N.; SAEED, N. A.; WANG, X.-D.; VANDENBOSCH, K. A.; ROSE, R. J. The Transcription Factor MtSERF1 of the ERF Subfamily Identified by Transcriptional Profiling Is Required for Somatic Embryogenesis Induced by Auxin Plus Cytokinin in *Medicago truncatula*^{1[W][OA]}. **Plant Phys.**, v. 146, p. 1622 - 1636, 2008.

- MAO, F.; LEUNG, W.-F.; XIN, X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. **BMC Biotech.**, doi:10.1186/1472-6750-7-76, 2007.
- MARCELINO, F. C.; BINECK, E. ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. **Circular técnica 47**. Londrina: Embrapa Soja, 2007.
- MARCELINO, F. C. **Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise**. Tese - Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Abiotic stress responses in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Sci.**, v. 164, p. 420 - 431, 2008.
- MENG, Q.; ZHANG, C.; GAI, J.; YU, D. Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Jour. Plant Phys.**, v. 164, p. 1002 - 1012, 2007.
- MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K. O.; CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Ana. Bioc.**, v. 320, p. 55-65, 2003.
- MITSUYA, Y.; TAKAHASHI, Y.; UEHARA, Y.; BERBERICH, T.; MIYAZAKI, A.; TAKAHASHI, H.; KUSANO, T. Identification of a novel Cys2/Hys2-type zinc-finger protein as a component of a spermine-signaling pathway in tobacco. **Jour. Plant Phys.**, v. 164, p. 785 - 793, 2007.
- MIURA, K.; JIN, J. B.; HASEGAWA, P. M. Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. **Cur. Opin. Plant Biol.**, v. 10, p. 495, 502, 2007.
- MONTIEL, G.; GANTET, P.; JAY-ALLEMAND, C.; BRETON, C. Transcription factor networks, pathways to the knowledge of root development. **Plant Phys.**, v. 136, p. 3478 - 3485, 2004.
- MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **PNAS**, v. 101, p. 6309 - 6314, 2004.
- NAKASHIMA, K.; TRAN, L.-S. P.; NGUYEN, D. V.; FUJITA, M.; MARUYAMA, K.; TOKADA, D.; ITO, Y.; HAYASHI, N.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. **Plant Jour.**, v. 51, p. 617 - 630, 2007.
- NÀÀR, A. M., LEMON, B. D., TJIAN, R. Transcriptional coactivator complexes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 475 - 501. 2001.

- NELSON, D. E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T. R.; CREELMAN, R. A.; WU, J.; WARNER, D. C.; ANSTROM, D. C.; BENSON, R. J.; CASTIGLIONI, P. P.; DONNARUMMO, M. G.; HINCHEY, B. S.; KUMIMOTO, R. W.; MASZLE, D. R.; CANALES, R. D.; KROLIKOWSK, K. A.; DOTSON, S. B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O. J.; HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y(NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. **PNAS**, v. 104, p. 16450 - 16455, 2007.
- NEPOMUCENO, A. L. ; NORMAN, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biot. Ciê. Des.**, 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. **Nuc. Aci. Res.**, v. 31, p. 3491 - 3496, 2003.
- NIJHAWAN, A.; JAIN, M.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. **Plant Phys.**, v. 146, p. 333 - 350, 2008.
- NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Rev. Biot. Ciên, & Des.**, v. 33, p. 10 - 13, 2004.
- OLSEN, A. N.; ERNST, H.; LEGGIO, L. L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends Plant Sci.**, v. 10, p. 79 - 87, 2005.
- ONATE-SÁNCHEZ, L.; ANDERSON, J. A.; YOUNG, J.; SINGH, K. B. AtERF14, a Member of the ERF Family of Transcription Factors, Plays a Nonredundant Role in PlantDefense^{1[C][W][OA]}. **Plant Phys.**, v. 143, p. 400 - 409, 2007.
- 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 Prod. Sci.**, v. 7, p. 129 - 137, 2004.
- PETERS, S.; MUNDREE, S. G.; THOMSON, J. A.; FARRANT, J. M.; KELLER, F. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 1947 - 1956, 2007.
- PANIKULANGARA, T. J.; EGGERS-SCHUMACHER, G.; WUNDERLICH, M.; STRANSKY, H.; SCHOFFL, F. Galactinol synthase! A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in Arabidopsis. **Plant Phys.**, v.136, p. 3148-3158, 2004.
- 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.

- 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. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 279 -289, 2007.
- QIN, F.; KAKIMOTO, M.; SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; TRAN, L. - S. P.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **Plant Jour.**, v. 50, p. 54 - 69, 2007.
- QU, L. J.; ZHU, Y. X. Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, p. 1 - 6, 2006.
- 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 Phys.**, v. 133, p. 1755 - 1767, 2003.
- REINDERS, J.; SICKMANN, A. Modificomics: posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. **Biomol. Eng.**, 2007.
- REYES, J. L.; CHUA, N-H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. **Plant Jour.**, v. 49, p. 592 - 606, 2007.
- RIECHMANN, J. L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C. - Z.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O. J.; SAMAHA, R. R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J. Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B. K.; YU, G. - L. *Arabidopsis* transcription factors: Genome - wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, v. 290, p. 2105 - 2110, 2000.
- RODRIGUEZ - URIBE, L.; O'CONELI, M. A. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and comun bean (*P. vulgaris*). **Jour. Exp. Bot.**, v. 57, p. 1391 - 1398, 2006.
- ROOK, F. HADINGHAM, S. A.; LI, Y.; BEVAN M. W. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. **Plant Cell Env.**, v. 29, p. 426 - 434, 2006.
- ROYCHOUDHURY, A.; ROY, C.; SENGUPTA, D. N. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 1839 - 1859, 2007.
- SAKAMOTO, H.; MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; MESHI, T.; IWABUCHI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. **Plant Phys.**, v. 136, p. 2734 - 2746, 2004.

- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; QIN, F.; OSAKABE, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. **PNAS**, v. 1-6, 2006.
- SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. V.; MOURÃO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. **Jour. Chem. Ecol.**, DOI 10.1007/s10886-008-9522-3, 2008.
- SCHIERMEIER, Q. The costs of global warming. **Nature**, v. 439, p. 374 - 375, 2006.
- SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 10, p. 296 - 302, 2007.
- 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. **Plant Jour.**, v. 31, p. 279 - 292, 2002.
- 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.
- SHAO, H-B.; GUO, Q-J.; CHU, L-Y.; ZHAO, X-N.; SU, Z-L.; HU, Y-C.; CHENG, J-F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Sci. Dir.**, v. 54, p. 37 - 45, 2007.
- SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT H. J.; NGUYEN, H. T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Jour. Exp. Bot.**, v. 55, p. 2343 - 2351, 2004.
- SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant Cell Env.**, v. 25, p. 211 - 222, 2002.
- SHINOZAKI, K & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 221 - 227, 2007.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 6, p. 410 - 417, 2003.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 3, p. 217 - 223, 2000.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; ONATE-SANCHES, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 5, p. 430 - 439, 2002.

SPOLEEN, W. G.; TAO, W.; VALLIYODAN, B.; CHEN, K.; HEJLEK, L. G.; KIM, J.-J.; LENOBLE, M. E.; ZHU, J.; BOHNERT, H. J.; HENDERSON, D.; SCHACHTMAN, D. P.; DAVIS, G. E.; SPRINGER, G. K.; SHARP, R. E. NGUYEN, H. T. Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential **BMC Plant Biol.**, doi:10.1186/1471-2229-8-32, 2008.

STOKSTAD, E. States sue over global warming. **Science**, v. 305, p. 590, 2004.

STOLF, R. **Identificação e análise da expressão de genes relacionados com a tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real.** Tese - Unesp - Campos Jaboticabal, 2007.

STOLF, R. **Avaliações morfo-anatômicas, ecofisiológicas e expressão gênica diferencial em duas cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], durante períodos de déficit hídrico.** Dissertação - Universidade Estadual de Londrina, 2005.

STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Jour.**, v. 50, p. 660 - 677, 2007.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 447 - 456, 2001.

SURALTA, R. R.; YAMAUCHI, A. Root growth, aerenchyma development, and oxygen transport in rice genotypes subjected to drought and waterlogging. **Env. Exp. Bot.** doi:10.1016/j.envexpbot.2008.01.004, 2008.

TALAMÈ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis **Jour. Exp. Bot.**, v. 58, p. 229 - 240, 2007.

TANG, M.; SUN, J.; LIU, Y.; CHEN, F.; SHEN, S. Isolation and functional characterization of the JcERF gene a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. **Plant Mol. Biol.**, v. 63, p. 419 - 428, 2007.

TORRES, G. A. M.; PFLIEGER, S.; CORRE-MENGUY, F.; MAZUBERT, C.; HARTMANN, C.; LELANDAIS-BRIÈRE, C. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. **Plant Sci.**, v. 171, p. 300 - 307, 2006.

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. **Plant Jour.**, v. 49, p. 46 - 63, 2007.

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.

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

VESELOV, D. S.; SABIRZHANOVA, I. B.; SABIRZHANOV B. E.; CHEMERIS A. V. Changes in Expansin Gene Expression, IAA Content, and Extension Growth of Leaf Cells in Maize Plants Subjected to Salinity. **Russ. J Plant Physiol.** 2008.

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. **Ana. Bioc.**, v. 300, p. 269 - 273, 2002.

WANG, H.; ZHANG, H.; GAO, F.; LI, J.; LI, Z. Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. **Theor. Appl. Genet.**, v. 115, p. 1109 - 1126. 2007.

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

WU, Y.; COSGROVE, D. J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. **Jour. Exp. Bot.**, v. 51, p. 1543 - 1553. 2000.

XU, S.; WANG, X.; CHEN, J. Zinc finger protein 1 (ThZFI) from salt cress (*Thellungiella halophila*) is a Cys-2/Hys-2-type transcription factor involved in drought and salt stress. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 497 - 506, 2007.

YAMADA, M.; MORISHITA, H.; URANO, K.; SHIOZAKI, N.; YAMAGUCHI -SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIBA, Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Jour. Exp. Bot.**, v. 417, p. 1975 - 1981, 2005.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 781 - 803, 2006.

YANHUI, C.; XIAOYUAN, Y.; KUN, H.; MEIHUA, L.; JIGANG, LI.; ZHAOFENG, G.; ZHIQIANG, L.; YUNFEI, Z.; XIAOXIAO, W.; XIAOMING, Q.; YUNPING, S.; LI, Z.; XIAOHUI, D.; JINGCHU, L.; XING-WANG, D.; ZHANGLIANG, C.; HONGYA, G.; LI-JIA, Q. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Mol. Biol.**, v. 60, p. 107 - 124, 2006.

YOSHIMURA, K.; MASUDA, A.; KUWANO, M.; YOKOTA, A.; AKASHI, K. Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. **Plant Cell Phys.**, v. 49, p. 226 - 241, 2008.

ZHAO, C.; AVCI, U.; GRANT, E. H.; HAIGLER, C. H.; BEERS, E. P. XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. **Plant Jour.**, v. 53, p. 425 - 436, 2008.

ZHOU, J.; WANG, X.; JIAO, Y.; QIN, Y.; LIU, X.; HE, K.; CHEN, C.; MA, L.; WANG, J.; XIONG, L.; ZHANG, Q.; FAN, L.; DENG, X. W. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf and panicle. **Plant Mol. Biol.**, v. 63, p. 591 - 608, 2007.

ZHU, J.; ALVAREZ, S.; MARSH, E. L.; LENOBLE, M. E.; CHO, I.-J.; SIVAGURU, M. CHEN, S.; NGUYEN, H. T.; WU, Y.; SCHACHTMAN, D. T.; SHARP, R. E. Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. II. Region-Specific Changes in Water Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins under Water Deficit^{1[W][OA]}. **Plant Phys.**, v. 145, p. 1533 - 1548, 2007

ZHUANG, J.; CAI, B.; PENG, R.-H.; ZHU, B.; JIN, X.-F.; XUE, Y.; GAO, F.; FU, X.-Y.; TIAN, Y.-S.; ZHAO, W.; QIAO, Y.-S.; ZHANG, Z.; XIONG, A.-S.; YAO, Q.-H. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 371, p. 468 - 474, 2008.

ZLATEV, Z. S.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; YORDANOV, I. T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivar. **Biol. Plant.**, v. 50, p. 389-394, 2006.

ZOU, M.; GUAN, Y.; REN, H.; ZHANG, F.; CHEN, F. A bZIP transcription factor, OsAB15, is involved in rice fertility and stress tolerance. **Plant Mol. Biol.**, v. 66, p. 675 - 683, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de Extração de RNA Total Utilizando Trizol

1. Homogeneizar o tecido em nitrogênio líquido, e adicionar 1 mL de Trizol (temperatura ambiente);
2. Centrifugar o material a 12.000 g, por 10 min, a 2 a 8°C
3. Remover o sobrenadante e transferir para um tubo novo;
4. Incubar por 5 min, a 15 a 30°C;
5. Adicionar 200 uL de clorofórmio para cada mL de Trizol utilizado inicialmente;
6. Fechar os tubos e agitar vigorosamente por 15 seg;
7. Incubar por 2-3min, a 15 a 30°C;
8. Centrifugar as amostras a 12.000 g, por 15 min, a 2 a 8°C;
9. Transferir a fase aquosa (aproximadamente 60% do volume) para um tubo novo;
10. Precipitar o RNA adicionando 0,5 mL de álcool isopropanol para cada mL de Trizol inicialmente utilizado;
11. Inverter os tubos para cima e para baixo vagarosamente, iniciando a formação do pellet de precipitação do RNA;
12. Incubar por 10min, a 15 a 30°C;
13. Centrifugar as amostras a 12.000 g, por 15 min, a 2 a 8°C;
14. Remover o sobrenadante e lavar o pellet de RNA uma vez, com etanol 75%, adicionando pelo menos 1 mL de etanol 75%, para cada 1 mL de Trizol utilizado inicialmente;
15. Centrifugar a 7.500 g, por 5 min, a 2-8°C;
16. Abrir os tubos e inverte-los sob papel absorvente, em bancada, a temperatura ambiente, por 5min, para secar o pellet (Cuidado para o pellet não escorregar pela parede do tubo);
17. Adicionar 50 uL de água MilliQ e deixar o pellet dissolver.
18. Após a extração, quantificar em NanoDrop ou espectro, correr um gel para verificar integridade do material e por fim, armazenar o RNA em freezer, a -80°C.

ANEXO B

Tabela 2 - Eficiência dos *primers* dos genes alvo e do controle endógeno utilizados

Primer	Concentração	Volume	Eficiência
<i>mybj7</i>	5 μ M	0,5 _M L	88,67%
<i>nac2</i>	5 μ M	0,5 _M L	87,80%
<i>c2h2</i>	5 μ M	0,5 _M L	92,57%
<i>bzip50</i>	5 μ M	0,5 _M L	98,78%
<i>B actina</i>	5 μ M	1,0 _M L	99,57%

ANEXO C

Curvas de dissociass o dos genes alvo *bZIP50*, *C2H2*, *MYBJ7* e *NAC2* e do normalizador *p-ACTINA*

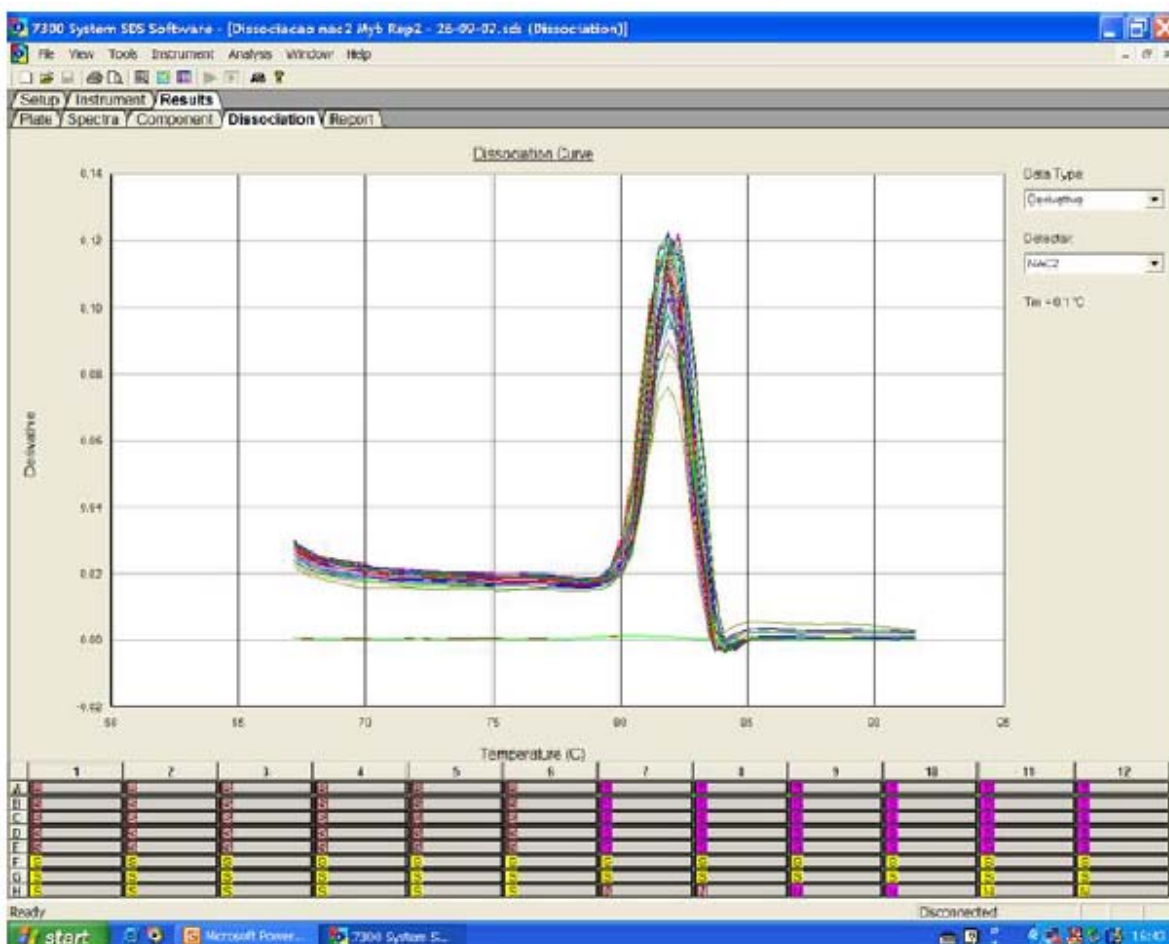


Figura 18 - Curva de dissoci o realizada ap s a re o de quantifica o relativa do gene *NAC2*

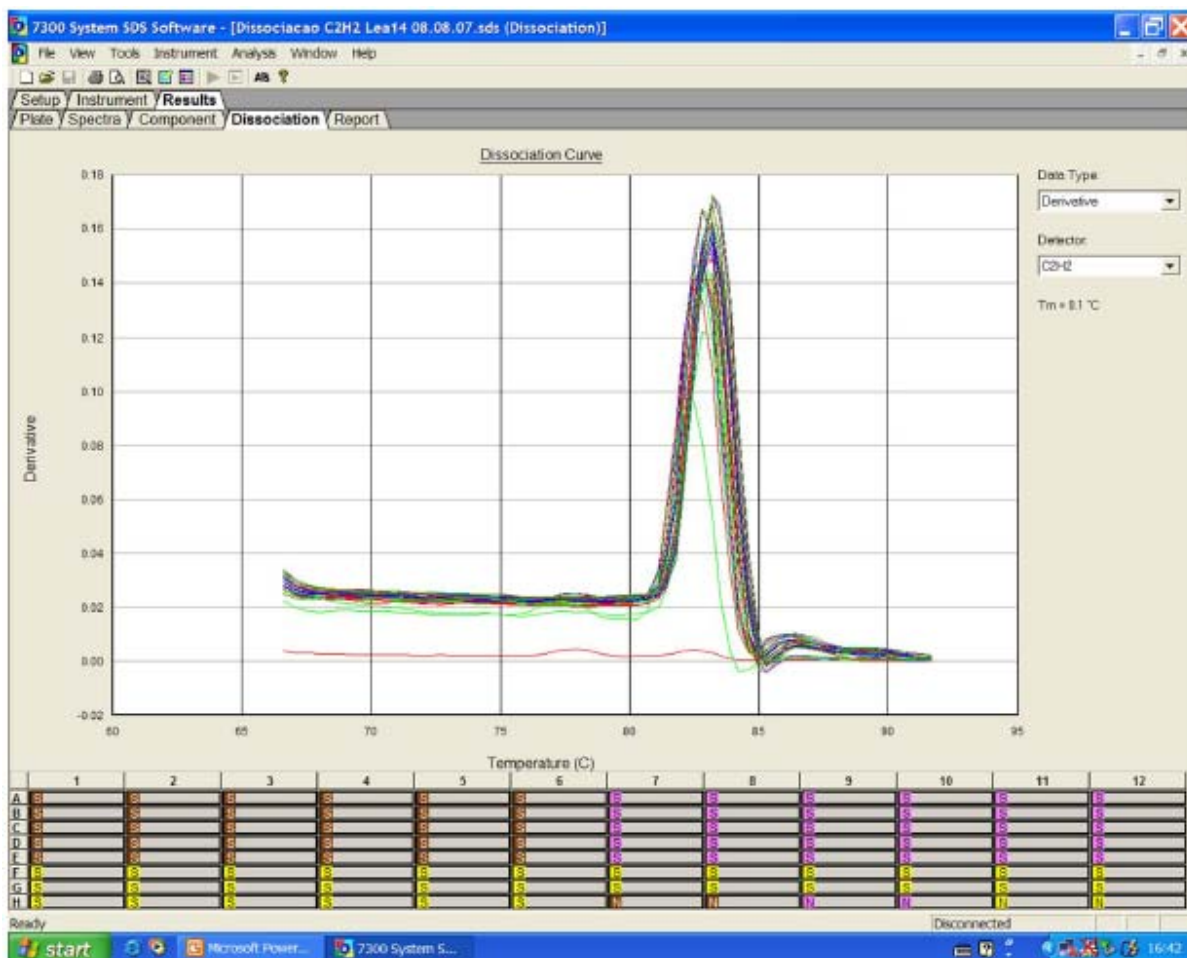


Figura 19 - Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene *C2H2*

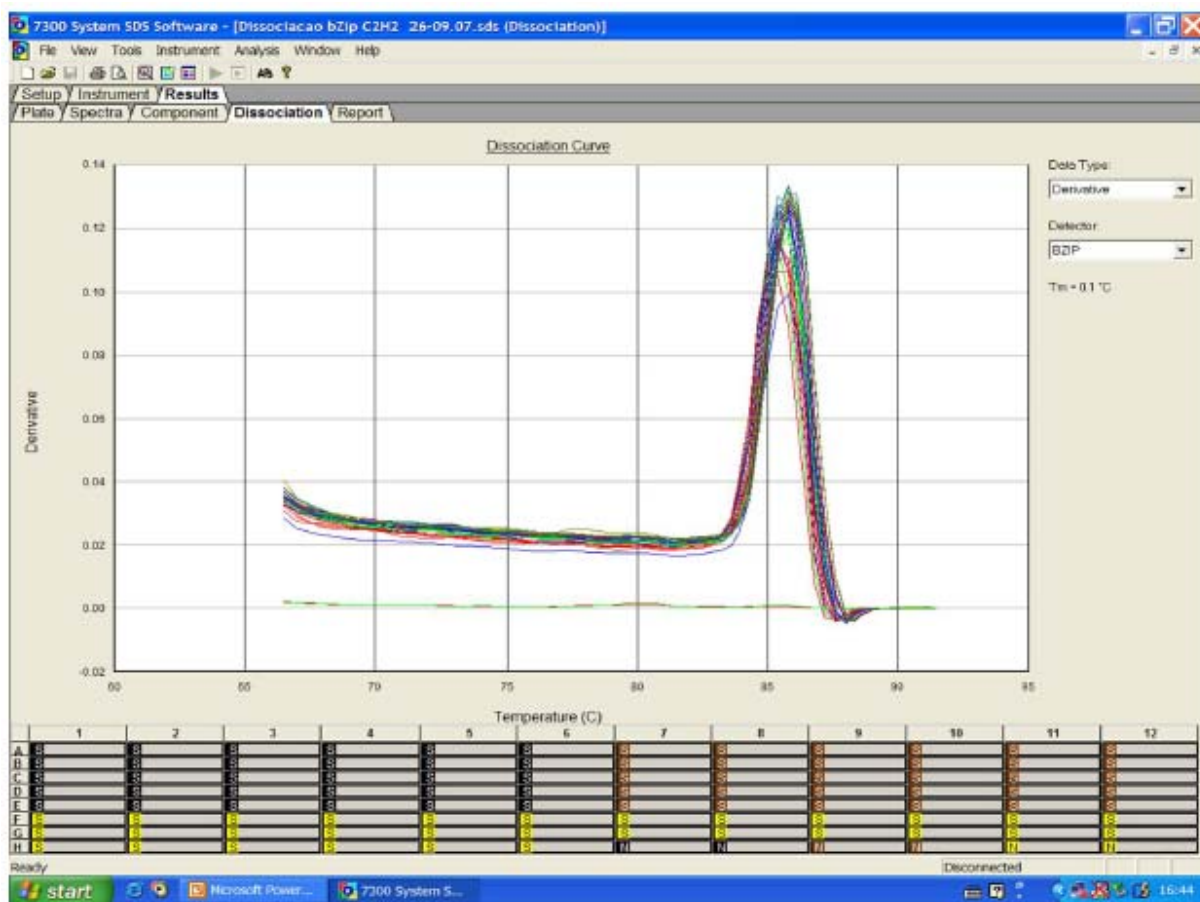


Figura 20 – Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene *bZIP50*

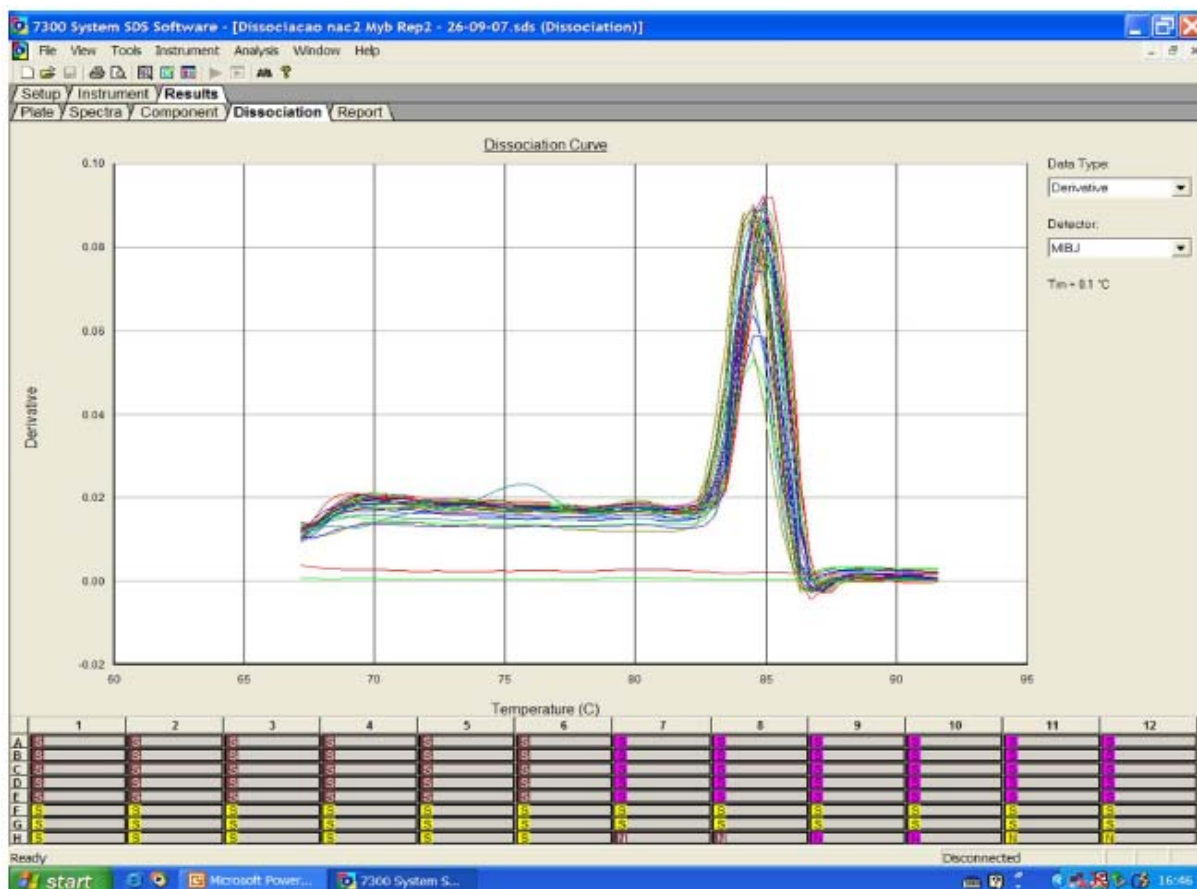


Figura 21 - Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do gene *MYBJ7*

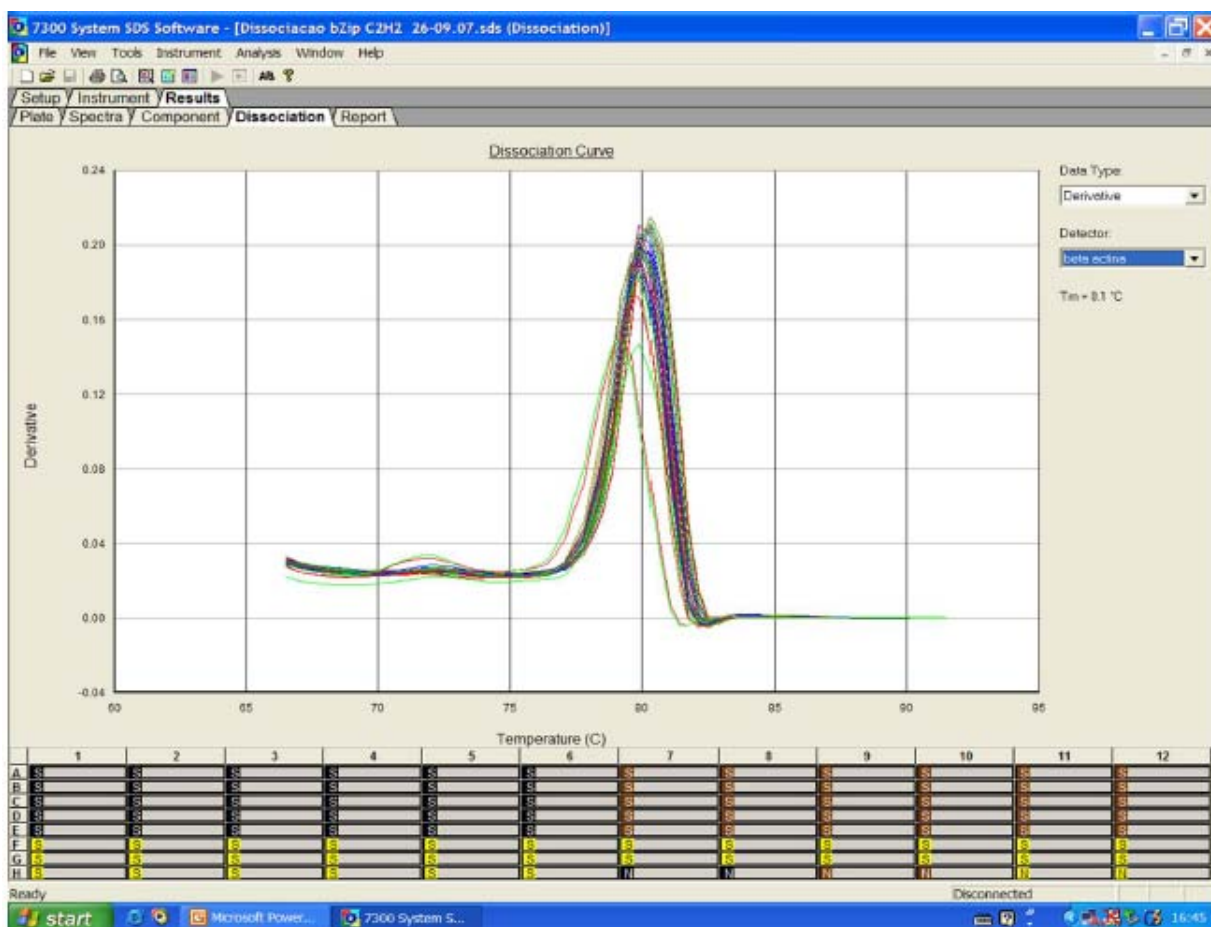


Figura 22 - Curva de dissociação realizada após a reação de quantificação relativa do normalizador *fi-ACTINA*

ANEXO D

Tabelas de análise de expressão gênica por RT qPCR dos genes Bzip50, C2H2, MYBJ7 e NAC2

Tabela 3: Expressão gênica relativa do gene *MYBJ7* em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT - qPCR, com a separação dos *bulks* utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA

AMOSTRA	Run	Ct MYBJ7	Média Ct MYBJ7	SD MYBJ7	Ct β -ACTINA	Média Ct β -ACTINA	SD β -ACTINA	Δ Ct	SD Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	SD RQ/Run	RQ Geral	SD Geral
Conquista T0	1	27,032	27,174	0,124	17,63	17,524	0,083	9,650	0,077441376	0,000	1,00000000	0,00117964	1,00000000	0
		27,26			17,486							0,00131333		
		27,231			17,457							0,0012548		
	2	34,573	35,995	1,335	23,58	23,714	0,253	12,281	0,679308963	0,000	1,00000000	0,00076549	1,00000000	0
		37,221			23,555							0,00076549		
		36,19			24,006							0,00076549		
Conquista T25	1	27,502	27,565	0,058	18,272	18,281	0,028	9,284	0,032413989	(0,366)	1,28877463	0,00156848	2,79115588	2,124687936
		27,617			18,313							0,00164057		
		27,577			18,259							0,00164057		
	2	32,152	32,311	0,313	22,03	22,133	0,145	10,179	0,172491908	(2,102)	4,29353713	0,00097228	2,79115588	2,124687936
		32,672			22,235							0,00097228		
		32,11			22,03							0,00097228		
Conquista T50	1	27,711	27,798	0,086	18,957	18,916	0,127	8,882	0,076518516	(0,768)	1,70330092	0,00223556	1,68983123	0,019049011
		27,799			18,774							0,00223556		
		27,883			19,017							0,00223556		
	2	33,091	33,487	0,407	21,729	21,951	0,251	11,536	0,239165912	(0,745)	1,67636155	0,00028538	1,68983123	0,019049011
		33,465			22,224							0,00028538		
		33,904			21,9							0,00028538		
Conquista T75	1	38,03	38,030	#DIV/0!	26,58	26,949	0,320	11,081	#DIV/0!	1,431	0,37095943	#DIV/0!	0,96212801	0,836038626
		abdo perdido			27,121							#DIV/0!		
		abdo perdido			27,147							#DIV/0!		
	2	32,472	32,912	0,904	21,125	21,266	0,155	11,646	0,458418841	(0,635)	1,55329660	0,00022715	0,96212801	0,836038626
		32,312			21,241							0,00022715		
		33,951			21,432							0,00022715		
Conquista T100	1	31,53	31,881	0,326	23,616	23,553	0,064	8,328	0,16624104	(1,322)	2,50070232	0,00277382	1,78660947	1,009879798
		31,938			23,556							0,00277382		
		32,175			23,488							0,00277382		
	2	33,589	33,821	0,201	21,624	21,641	0,031	12,180	0,10156484	(0,101)	1,07251662	0,00020085	1,78660947	1,009879798
		33,945			21,676							0,00020085		
		33,928			21,622							0,00020085		

AMOSTRA	Run	Ct C2H2	Média Ct C2H2	SD C2H2	Ct β -ACTINA	Média Ct β -ACTINA	SD β -ACTINA	Δ Ct	SD Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	SD RQ/Run	RQ Geral	SD Geral	
BR16 T0	1	30,275	30,112	0,172	19,23	19,290	0,070	10,822	0,13106932	0	1,00000000	0,00050431	1,00000000	0	
		29,933			19,367							0,00060480			
		30,129			19,273							0,00060480			
	2	31,189	31,23533333	0,06767816	21,048	21,137	0,083648072	10,09833333	0,076083288	0	1,00000000	0,00086536	1,00000000	0	
		31,313			21,214							0,00086536			
		31,204			21,149							0,00086536			
BR16 T25	1	28,464	28,622	0,244	21,177	21,186	0,010	7,436	0,172521013	(3,386)	10,45412203	0,00512279	6,67466468	5,344959842	
		28,903			21,184							0,00512279			
		28,499			21,196							0,00512279			
	2	30,724	31,08633333	0,395353428	22,721	22,155	22,52166667	0,317945488	8,564666667	0,27955709	(1,534)	2,89520733	0,00217582	6,67466468	5,344959842
		30,724			22,721								0,00217582		
		31,027			22,689								0,00217582		
BR16 T50	1	27,443	27,454	0,010	20,014	20,022	0,031	7,432	0,022071852	(3,390)	10,48556963	0,00570297	9,26316890	1,728735699	
		27,456			20,056							0,00570297			
		27,462			20,056							0,00570297			
	2	29,159	29,19033333	0,059542702	21,972	22,127	22,09933333	0,116001437	7,091	0,092199964	(3,007)	8,04076816	0,00688084	9,26316890	1,728735699
		29,159			21,972								0,00688084		
		29,259			22,199								0,00688084		
BR16 T75	1	30,886	30,667	0,439	20,889	20,571	0,179	9,985	0,335242201	(0,837)	1,78674448	0,00078216	3,26027428	2,083885831	
		30,954			20,571							0,00078216			
		30,162			20,587							0,00078216			
	2	32,032	32,211	0,174673982	24,463	24,307	24,35566667	0,093087772	7,855333333	0,098965061	(2,243)	4,73380409	0,00403197	3,26027428	2,083885831
		32,381			24,463								0,00403197		
		32,22			24,297								0,00403197		
BR16 T100	1	28,148	28,134	0,073	20,372	20,35	0,026	7,787	0,038893016	(3,036)	8,20024303	0,00440831	12,16135160	5,601853462	
		28,055			20,35							0,00440831			
		28,2			20,321							0,00440831			
	2	29,004	29,105	0,090	22,969	23,017	0,066	6,087	0,05597693	(4,011)	16,12246017	0,01414749	12,16135160	5,601853462	
		29,132			22,99							0,01414749			
		29,178			23,093							0,01414749			

Tabela 4: Expressão gênica relativa do gene *bZIP50* em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT - qPCR, com a separação dos *bulks* utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA.

AMOSTRA	Run	Ct bZIP50	Média Ct bZIP5	SD bZIP50	Ct β-ACTINA	Media Ct β-ACTII	SD β-ACTINA	ΔCt	SD Δ Ct	ΔΔCt	RQ	SD RQ/Run	RQ Geral	SD Geral	
Conquista T0	1	27,008			18,424							0,00246012			
		27,068	27,034	0,031	18,428	18,397	0,051	8,637	0,029720924	0,000	1,00000000				
		27,026			18,338								0,00256360	1,00000000	0
	2	30,926			23,589								0,00528360		
		31,05	31,040	0,109	23,475	23,537	0,058	7,503	0,061596131	0,000	1,00000000				
		31,143			23,547										
Conquista T25	1	26,807			19,227							0,00479738			
		26,931	26,898	0,079	19,241	19,234	0,007	7,664	0,039889579	(0,974)	1,96382540				
		26,955			19,234								0,00507001	1,65180450	0,441264185
	2	29,055			21,873								0,00715293		
		29,049	29,012	0,069	21,924	21,932	0,063	7,081	0,046582364	(0,422)	1,33978360				
		28,933			21,998								0,00763009		
Conquista T50	1	30,268			22,81							0,00483069			
		30,307	30,411	0,215	22,858	22,826	0,027	7,585	0,108554902	(1,052)	2,07388132				
		30,659			22,811								0,00561521	1,94320260	0,184807617
	2	28,378			21,512								0,00911665		
		28,546	28,411	0,122	21,81	21,766	0,236	6,645	0,132613473	(0,858)	1,81252388				
		28,309			21,977								0,01095662		
Conquista T75	1	26,821			20,111							0,00758695			
		27,437	27,085	0,317	20,272	20,207	0,085	6,878	0,164264015	(1,759)	3,38541649				
		26,996			20,237								0,00952717	2,92129523	0,656366589
	2	27,65			21,308								0,01272373		
		27,687	27,693	0,047	21,497	21,488	0,175	6,206	0,090667892	(1,297)	2,45717396				
		27,743			21,658								0,01442786		
Conquista T100	1	27,169			20,136							0,00700216			
		27,091	27,169	0,078	20,045	20,062	0,067	7,107	0,05131845	(1,531)	2,88919317				
		27,247			20,006								0,00751845	2,16506146	1,024076888
	2	28,878			22,072								0,00747709		
		29,054	29,051	0,172	22,041	22,075	0,036	6,976	0,087640364	(0,527)	1,44092975				
		29,221			22,113								0,00844301		
BR16 T0	1	26,267			20,118							0,01343796			
		26,302	26,303	0,037	20,116	20,112	0,009	6,191	0,026542419	0	1,00000000				
		26,34			20,102								0,01394162	1,00000000	0
	2	28,097			21,048								0,00557779		
		28,683	28,40666667	0,294418636	21,214	21,137	0,083648072	7,269666667	0,216424737	0	1,00000000				
		28,44			21,149								0,00752944		
BR16 T25	1	25,282			19,715							0,02041957			
		25,299	25,293	0,009	19,63	19,685	0,048	5,607	0,006570134	(0,584)	1,49865330				
		25,297			19,711								0,02060641	1,08957656	0,578521879
	2	30,257			22,721								0,00407808		
		30,531	30,46666667	0,159656924	22,155	22,52166667	0,317945488	7,825	0,112894494	0,555	0,68049981				
		30,252			22,689								0,00476897		
BR16 T50	1	24,862			19,252							0,01732720			
		24,935	24,952	0,099	19,145	19,161	0,085	5,791	0,059817779	(0,400)	1,31950791				
		25,058			19,085								0,01882531	1,90146831	0,82301629
	2	28,014			21,972								0,01496854		
		28,162	28,05666667	0,091767823	22,127	22,09933333	0,116001437	5,957333333	0,104588878	(1,312)	2,48342871				
		27,994			22,199								0,01730407		
BR16 T75	1	25,081			20,168							0,03313932			
		25,039	25,092	0,060	20,312	20,243	0,072	4,849	0,066312392	(1,342)	2,53502504				
		25,157			20,25								0,03833018	2,74826791	0,30157095
	2	30,133			24,463								0,01829299		
		29,942	30,059	0,102503658	24,307	24,35566667	0,093087772	5,703333333	0,069232098	(1,566)	2,96151077				
		30,102			24,297								0,02013569		
BR16 T100	1	25,189			20,45							0,02701284			
		25,562	25,522	0,314	20,517	20,470	0,041	5,052	0,158544421	(1,139)	2,20279209				
		25,814			20,443								0,03365297	2,53568265	0,470778338
	2	28,86			22,969								0,01792581		
		28,729	28,767	0,081	22,99	23,017	0,066	5,749	0,052484918	(1,520)	2,86857320				
		28,711			23,093								0,01927870		

Tabela 5: Expressão gênica relativa do gene *C2H2* em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT - qPCR, com a separação dos *bulks* utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA.

AMOSTRA	Run	Ct C2H2	Média Ct C2H2	SD C2H2	Ct β -ACTINA	Idia Ct β -ACTII	SD β -ACTINA	Δ Ct	SD Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	SD RQ/Run	RQ Geral	SD Geral	
Conquista T0	1	29,116	29,111	0,031	18,813	18,778	0,031	10,333	0,021973469	0,000	1,000000000	0,00076374	1,000000000	0	
		29,139			18,77							0,00078736			
		29,078			18,752							0,00148734			
	2	33,253	32,679	0,499	23,589	23,537	0,058	9,142	0,251053779	0,000	1,000000000	0,01005599	1,000000000	0	
		32,433			23,475							0,00148734			
		32,351			23,547							0,00148734			
Conquista T25	1	26,508	26,451	0,093	19,897	19,864	0,030	6,587	0,048800615	(3,746)	13,41399130	0,01075984	12,61088903	1,13575813	
		26,344			19,858							0,02006995			
		26,501			19,837							0,02006995			
	2	27,474	27,512	0,099	21,873	21,932	0,063	5,580	0,058485753	(3,562)	11,80778675	0,02176498	12,61088903	1,13575813	
		27,438			21,924							0,02006995			
		27,624			21,998							0,02176498			
Conquista T50	1	29,304	29,304	0,028	19,994	20,015	0,029	9,284	0,020287517	(1,049)	2,06909516	0,00158209	2,36569160	0,419450703	
		29,276			20,015							0,00162722			
		29,332			20,052							0,00421412			
	2	29,746	29,496	0,220	21,512	21,766	0,236	7,729	0,161220863	(1,413)	2,66228804	0,00526952	2,36569160	0,419450703	
		29,332			21,512							0,00421412			
		29,409			21,977							0,00526952			
Conquista T75	1	28,303	28,273	0,035	20,348	20,393	0,053	7,879	0,031755577	(2,453)	5,47680052	0,00415456	4,33758137	1,611099173	
		28,28			20,38							0,00434154			
		28,235			20,452							0,00526301			
	2	28,911	28,952	0,117	21,308	21,488	0,175	7,465	0,105229115	(1,677)	3,19836221	0,00608960	4,33758137	1,611099173	
		29,084			21,497							0,00526301			
		28,862			21,658							0,00608960			
Conquista T100	1	29,344	29,348	0,101	19,645	19,600	0,049	9,749	0,055894245	(0,584)	1,49899960	0,00111823	1,68772100	0,266892357	
		29,451			19,548							0,00120833			
		29,25			19,606							0,00324745			
	2	30,34	30,309	0,054	22,072	22,075	0,036	8,234	0,032475632	(0,908)	1,87644239	0,00339700	1,68772100	0,266892357	
		30,341			22,041							0,00339700			
		30,247			22,113							0,00339700			
BR16 T0	1	30,275	30,112	0,172	19,23	19,290	0,070	10,822	0,13106932	0	1,000000000	0,00050431	1,000000000	0	
		29,933			19,367							0,00060480			
		30,129			19,273							0,00086536			
	2	31,189	31,23533333	0,06767816	21,048	21,137	0,083648072	10,09833333	0,076083288	0	1,000000000	0,00096162	1,000000000	0	
		31,313			21,214							0,00086536			
		31,204			21,149							0,00096162			
BR16 T25	1	28,464	28,622	0,244	21,177	21,186	0,010	7,436	0,172521013	(3,386)	10,45412203	0,00512279	6,67466468	5,344859842	
		28,903			21,184							0,00650691			
		28,499			21,196							0,00217582			
	2	30,724	31,08633333	0,395363428	22,721	22,155	22,52166667	0,317945488	8,564666667	0,27955709	(1,534)	2,89520733	0,00320576	6,67466468	5,344859842
		31,027			22,689								0,00320576		
		30,724			22,721								0,00320576		
BR16 T50	1	27,443	27,454	0,010	20,014	20,022	0,031	7,432	0,022071852	(3,390)	10,48556963	0,00570297	9,26316890	1,728735699	
		27,456			19,995							0,00588016			
		27,462			20,056							0,00688084			
	2	29,159	29,19033333	0,059542702	21,972	22,127	22,09933333	0,116001437	7,091	0,092199964	(3,007)	8,04076816	0,00781900	9,26316890	1,728735699
		29,153			22,199								0,00781900		
		29,259			22,199								0,00781900		
BR16 T75	1	30,886	30,667	0,439	20,889	20,571	20,682	0,179	9,965	0,335242201	(0,837)	1,78674448	0,00078216	3,26027428	2,083885831
		30,954			20,571								0,00124490		
		30,162			20,587								0,00403197		
	2	32,032	32,211	0,174673982	24,463	24,307	24,35566667	0,093087772	7,855333333	0,098965061	(2,243)	4,73380409	0,00462488	3,26027428	2,083885831
		32,381			24,297								0,00462488		
		32,22			24,297								0,00462488		
BR16 T100	1	28,148	28,134	0,073	20,372	20,35	20,348	0,026	7,787	0,038893016	(3,036)	8,20024303	0,00440831	12,16135160	5,601853462
		28,055			20,35								0,00465251		
		28,2			20,321								0,01414749		
	2	29,004	29,105	0,090	22,969	22,99	23,017	0,066	6,087	0,05597693	(4,011)	16,12246017	0,01528906	12,16135160	5,601853462
		29,132			22,99								0,01528906		
		29,178			23,093								0,01528906		

Tabela 6: Expressão gênica relativa do gene *NAC2* em raízes de soja, das cultivares tolerante Conquista e sensível BR16, submetidas ao estresse de déficit hídrico, utilizando a técnica de RT - qPCR, com a separação dos *bulks* utilizados anteriormente na técnica de microarranjo de cDNA.

AMOSTRA	Run	Ct NAC2	Média Ct NAC2	SD NAC2	Ct β -ACTINA	sdia Ct β -ACTII	SD β -ACTINA	Δ Ct	SD Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	RQ	SD RQ/Run	RQ Geral	SD Geral	
Conquista T0	1	20,586	20,466	0,119	16,884	16,928	0,066	3,537	0,067802409	0,000	1,00000000	0,08217619	1,00000000	0	
		20,462			16,897							0,09027492			
		20,349			17,004							0,02480072			
	2	28,794	28,896	0,165	23,58	23,714	0,253	5,182	0,151140939	0,000	1,00000000	0,11483706	1,00000000	0	
		28,808			23,555										
		29,086			24,006										
Conquista T25	1	19,466	19,571	0,130	19,153	18,765	0,336	0,806	0,180204282	(2,732)	6,64222534	0,50492081	5,30362980	1,893059961	
		19,53			18,582							0,64821199			
		19,716			18,56							0,10383321			
	2	25,229	25,293	0,084	22,03	22,098	0,119	3,195	0,072660168	(1,987)	3,96503426	0,11483706	5,30362980	1,893059961	
		25,262			22,235										
		25,388			22,029										
Conquista T50	1	23,914	23,781	0,131	22,609	22,478	0,113	1,303	0,086428198	(2,235)	4,70653938	0,38180427	6,05021406	1,90024295	
		23,776			22,418							0,43040345			
		23,653			22,408							0,18342833			
	2	24,11	24,247	0,166	21,729	21,951	0,251	2,296	0,150711645	(2,886)	7,39388873	0,22604966	6,05021406	1,90024295	
		24,199			22,224										
		24,432			21,9										
Conquista T75	1	18,84	18,916	0,067	19,168	19,117	0,054	(0,201)	0,043050358	(3,738)	13,34289670	1,11544263	9,02743822	6,102979917	
		18,966			19,122							1,18403935			
		18,942			19,06							0,10188569			
	2	23,774	24,212	0,681	21,125	21,241	21,266	0,155	2,946	0,348976718	(2,236)	4,71197973	0,16527916	9,02743822	6,102979917
		23,866			21,241										
		24,996			21,432										
Conquista T100	1	19,87	19,557	0,271	20,131	20,206	0,075	(0,650)	0,140764579	(4,187)	18,21430447	1,42296688	15,52756774	3,799619515	
		19,4			20,207							1,72959139			
		19,4			20,281							0,34104681			
	2	23,24	23,140	0,100	21,624	21,676	21,641	0,031	1,500	0,05229165	(3,683)	12,84083101	0,36668801	15,52756774	3,799619515
		23,04			21,676										
		23,141			21,622										
BR16 T0	1	23,317	23,311	0,020	20,118	20,112	0,009	3,199	0,015593802	0	1,00000000	0,10774849	1,00000000	0	
		23,288			20,116							0,11010311			
		23,327			20,102							0,01152309			
	2	27,542	27,661	0,254316732	21,289	21,375	21,63333333	0,523692976	6,027666667	0,411662078	0	1,00000000	0,02038986	1,00000000	0
		27,953			21,375										
		27,488			22,236										
BR16 T25	1	21,926	21,389	0,465	19,715	19,63	19,685	0,048	1,704	0,328642917	(1,495)	2,81799034	0,24440693	4,59555556	2,513856835
		21,123			19,63								0,38545729		
		21,119			19,711								0,09523370		
	2	25,982	26,022	0,05192823	22,547	22,759	22,674	0,112066944	3,355666667	0,036717389	(2,672)	6,37312077	0,10020669	4,59555556	2,513856835
		26,022			22,759										
		26,085			22,716										
BR16 T50	1	20,915	21,047	0,122	19,252	19,145	19,161	0,085	1,886	0,059817779	(1,312)	2,48342871	0,25950763	9,00320272	9,220352821
		21,157			19,145								0,19988086		
		21,069			19,085								0,19988086		
	2	24,072	24,315	0,287075494	22,392	22,03	22,27233333	0,209872183	2,071333333	0,251454436	(3,956)	15,52297672	0,28324475	9,00320272	9,220352821
		24,315			22,392										
		24,644			22,395										
BR16 T75	1	19,851	19,819	0,068	20,168	20,312	20,243	0,072	(0,424)	0,070104684	(3,623)	12,32059479	1,27830194	13,68169101	1,924880743
		19,741			20,312								1,40877188		
		19,865			20,25								0,22359836		
	2	25,922	25,911	0,012124356	23,733	23,755	23,79433333	0,087871118	2,116666667	0,044351813	(3,911)	15,04278724	0,23777767	13,68169101	1,924880743
		25,913			23,733										
		25,898			23,895										
BR16 T100	1	19,676	19,439	0,208	20,45	20,517	20,470	0,041	(1,031)	0,105869416	(4,229)	18,75668975	1,89841743	25,80917350	9,973718159
		19,287			20,517								2,19852522		
		19,355			20,443								0,40293613		
	2	24,002	24,100	0,119	22,383	23,419	23,111	0,633	0,989	0,322043605	(5,038)	32,86165724	0,62968852	25,80917350	9,973718159
		24,233			22,383										
		24,066			23,531										