

WELLINGTON SILVA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

WELLINGTON SILVA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS A RESISTÊNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM SOJA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 29 de Julho de 2009.

Dr. André Narvaes da Rocha
Campos

Prof. José Eustaquio de Souza
Carneiro

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Coorientador)

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta
(Coorientador)

Prof. Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)

A minha mãe! Exemplo de coragem, dedicação e fé. Que fez de nossas vidas um milagre, pois ser mãe solteira, trabalhar em dois empregos, cuidar da casa e ainda achar tempo para levar o filho para treinar futebol..... ISSO É UM MILAGRE.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo Dom da vida e, pela presença e amor incondicional.

A minha mãe amada que mesmo distante, se fez presente em pensamento, coração e alma. Obrigado por seus ensinamentos e vida. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos, você é a pessoa que admiro, amo e respeito, pelo ontem, por hoje, pelo amanhã e para sempre.

A minha mainha, que fisicamente conhecidos de pouco tempo, mas espiritualmente amigos de longa data. Tenho enorme carinho por ti.

Ao Prof. Dr. Aluizio Borém, orientador, amigo, pai. Por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, dedicação. Agradeço, por todos os momentos em que me acolheu com um simples sorriso, obrigado!

Ao Prof. Dr. Marcelo Loureiro que me proporcionou a realização deste trabalho me permitindo trabalhar em seu laboratório. Obrigado por todos os ensinamentos, lhe admiro muito.

Aos coordenadores, professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por toda a atenção, dedicação, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Aos meus amigos de Uberlândia e Brasília, que mesmo longe, ofereceram seu carinho incondicional para que eu pudesse continuar o trabalho. Amo todos vocês.

Aos amigos de Viçosa, em especial aos de minha república: Márcio, Flávio, Rodrigo e Thiago, que sofreram e conseguiram me suportar! Vocês são muito especiais.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

BIOGRAFIA

WELLINGTON SILVA GOMES, filho de Maura Luiza da Silva e Geraldo Gomes Ribeiro, nasceu na cidade de Uberlândia, dia 14 de maio de 1983.

Em setembro de 2002, ingressou na Universidade Federal de Uberlândia, diplomando-se Biólogo em Fevereiro de 2007.

Em março de 2008, iniciou na pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL DE MÉTODOS.....	5
2.1. Material Genético e Delineamento Experimental.....	5
2.2. Caracterização Fisiológica	5
2.2.1. Peroxidação Lipídica – Espécies Reativas de Oxigênio	5
2.2.2. Efeito do Estresse Hídrico sobre a atividade de Enzimas do Sistema Antioxidativo.....	6
2.2.3. Determinação de Proteínas.....	7
2.2.4. Análises Estatísticas	7
2.3. Análise da Expressão de Genes	8
2.3.1. Identificação de Sequências.....	8
2.3.2. Desenho de Iniciadores	8
2.3.3. Extração de RNA.....	9
2.3.4. Síntese de DNA de Fita Simples.....	10
2.3.5. PCR em Tempo Real.....	10
2.3.5.1 Validação.....	11
2.3.5.2. Quantificação relativa	12
2.3.5.3. Curva de dissociação	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
3.1. Peroxidação de lipídios.....	13
3.2. Atividade das Enzimas Antioxidantes	14
3.3. PCR em Tempo Real	18
4. CONCLUSÕES.....	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

GOMES, Wellington Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009.
Caracterização fisiológica e expressão de genes relacionados à resistência ao déficit hídrico em soja. Orientador: Aluizio Borém. Co-Orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Eveline Teixeira Caixeta.

Tolerância à seca em plantas é uma característica complexa, resultado de um conjunto de mecanismos que trabalham para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico. O estresse hídrico é um dos mais importantes fatores ambientais que induz mudanças fisiológicas, como diminuição do potencial de água na célula, o fechamento dos estômatos e o desenvolvimento de processos oxidativos mediante a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e Peroxidase (POX) são eficientes eliminadores das EROs. Dois cultivares de soja (BR-16 e Embrapa 48), com respostas contrastantes ao déficit hídrico, foram estudadas com o uso da técnica de PCR em Tempo Real para identificar genes que podem apresentar diferenças de expressão durante períodos de seca. A caracterização fisiologia dos genótipos demonstrou diferenças significativas entre eles. Houve aumento considerável na peroxidação de lipídios no genótipo sensível, enquanto que, no tolerante, a quantidade de MDA (aldeído malônico formado) foi significativamente igual ao controle irrigado. O aumento da atividade das enzimas antioxidativas, SOD e POX, foi significativo apenas no genótipo suscetível, nos potenciais hídricos de -1,5MPa, para a primeira e -3,0MPa para a segunda. O genótipo BR-16, quando submetido ao estresse hídrico, demonstrou aumento de expressão gênica para os genes OST1, SnRK2.2 e SnRK2.3. Em contrapartida, o genótipo Embrapa 48 não demonstrou alteração nos níveis de expressão para nenhum dos quatro genes testados. A tolerância do genótipo Embrapa 48 não se relaciona a expressão dos genes, nem tão pouco com o aumento da atividade de enzimas antioxidativas, aqui analisados. Isso indica a necessidade de compreendermos melhor os processos bioquímicos, fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância desse genótipo ao déficit hídrico. O estudo da expressão desses genes e a identificação dos genes responsáveis pelo aumento da tolerância no genótipo Embrapa 48, poderão ser utilizados em programas de melhoramento visando a obtenção de plantas tolerantes ao déficit hídrico.

ABSTRACT

GOMES, Wellington Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2009.
Physiological characterization and expression of genes related to the resistance to the hídrico deficit in soy. Adviser: Aluizio Borém. Co-Advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Eveline Teixeira Caixeta.

Drought tolerance in plants is a complex trait, the result of a set of mechanisms that work to prevent or tolerate periods of drought. Water stress is one of the most important environmental factors that induce physiological changes, such as reduced water potential in the cell, stomatal closure and the development of oxidative processes by the formation of reactive oxygen species (EROs). The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POX) are efficient suppressors of ROS. Two soybean cultivars (BR-16 and Embrapa 48), with contrasting responses to water stress were studied using the technique of Real-Time PCR to identify genes that may exhibit differences in expression during periods of drought. Physiological characterization of the genotypes showed significant differences between them. There was considerable increase in lipid peroxidation in the sensitive genotype, while in the tolerant, the amount of MDA (formed malonic aldehyde) was significantly equal to control irrigation. The increased activity of antioxidant enzymes, SOD and POX, was significant only in the susceptible genotype, on the potentials of -1.5 MPa for a first and -3.0 MPa for the second. The genotype BR-16, when subjected to water stress, showed increased gene expression for genes OST1, SnRK2.2 and SnRK2.3. In contrast, the genotype Embrapa 48 showed no change in expression levels for any of the four genes tested. The tolerance of the genotype Embrapa 48 is not related to gene expression, nor with the increased activity of antioxidant enzymes, analyzed here. This indicates the need to better understand the biochemical processes, physiological and molecular processes involved in tolerance of this genotype to water deficit. The study of expression of these genes and identification of genes responsible for increased tolerance in the genotype Embrapa 48 may be used in breeding programs aimed at obtaining plants tolerant to drought.

1. INTRODUÇÃO

Originária de clima temperado, a soja *Glycine max* (L.) Merrill, apresenta ampla adaptação aos climas subtropicais e tropicais. É considerada uma das mais importantes leguminosas no mundo; cultivada em 21.334 milhões de hectares na safra 07/08, e com uma produção de 60,051 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2008), o Brasil é atualmente o primeiro no ranking em termos de exportação de soja e o segundo maior produtor mundial, com a perspectiva de se tornar o primeiro em poucos anos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2008).

A cultura da soja é afetada por fatores bióticos e abióticos. Perdas causadas por estresses abióticos, como a seca, causam em média mais de 50% das perdas mundiais, enquanto que prejuízos causados por estresses bióticos reduzem em média de 10 a 20% da produtividade das culturas (BRAY, 2004). A ocorrência de adversidades climáticas cada vez mais freqüentes e intensas tem representado um sério problema à produção agrícola. A disponibilidade hídrica, bastante variável em termos espacial e temporal, constitui-se no principal limitante à obtenção de rendimentos mais próximos ao máximo potencial produtivo. Para os produtores, o desafio é então produzir mais com o dado suprimento de água, possivelmente limitado (PASSIOURA, 2007).

Compreender como as plantas respondem ao déficit hídrico e os mecanismos de tolerância são de importância fundamental para prever os impactos na produção das culturas e constitui-se atualmente em um dos maiores tópicos de pesquisa (ATKIN; MACHEREL, 2008; BARTELS; SUNKAR, 2005). Logo, a fisiologia do estresse em plantas está aumentando sua importância e ganhando atenção em todo o mundo, principalmente devido às mudanças climáticas globais (SHAO et al., 2007).

A série de respostas (mudanças) causada pela seca nas plantas é de ordem fisiológica, bioquímica, morfológica e molecular (LEI; TONG; SHENGYAN, 2006; WANG et al., 2001), por alterações em seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (BARTELS; SUNKARS, 2005). Quando a regulação por meios dessas respostas é inadequada, e o metabolismo não se ajusta para a manutenção das funções, danos e eventual morte podem resultar (LAWLOR, 2002).

Durante a seca a disponibilidade hídrica do solo diminui e o *continuum* solo-planta-atmosfera pode ser perdido (VASELLATI et al., 2001). A planta, portanto, fecha seus

estômatos para prevenir perdas de água (STUHFAUTH; SCHEUERMANN, FOCK, 1990; OHASHI et al, 2006). Ao pequeno decréscimo no potencial hídrico da planta então, resulta primeiramente na queda da condutância estomática (G_s) mesmo sob condições hídricas favoráveis, devido à sinalização por parte das raízes para as partes aéreas (LEI; TONG, SHENGYAN, 2006). O fechamento estomático, limitando a difusão de CO_2 dos intercelulares para dentro do cloroplasto durante a seca, se dá em resposta ao aumento do fitormônio ácido abscísico (ABA) nessas condições (CORNIC, 2000; LIMA et al., 2002). Essa percepção por parte das raízes do secamento do solo promove um acúmulo de ácido abscísico (ABA) nesse órgão, que é redistribuído nos tecidos da planta via xilema, agindo como um sinalizador químico para o fechamento dos estômatos e induzindo a expressão de genes relacionados ao estresse (LIU; JENSEN; ANDERSEN, 2005; SEKI et al ., 2007).

A limitação da fotossíntese, que reduz o consumo de elétrons liberados da água, causa o excesso de energia e se o estado excitado da clorofila não for rapidamente dissipado pela transferência de elétron ou fotoquímica, ela pode reagir com o oxigênio, formando as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), que incluem o singleto (1O_2), ânions radicais de superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) (APEL; HIRT, 2004; BARTLES, 2001; CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003; SMIRNOFF; BRYANT, 1999; ASADA, 1999). A produção de ROS pode iniciar o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídeos, um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, pois causa a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998).

Os mecanismos enzimáticos de defesa contra ROS em plantas incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT). SOD age como uma primeira defesa contra EROs, dismutando o superóxido para H_2O_2 . APX, GPX e CAT subsequente detoxificam H_2O_2 . A enzima peroxidase (POX) atua na eliminação do peróxido de hidrogênio. Em contraste a CAT, APX requer um sistema de regeneração de ascorbato e glutathione. Destoxificação de H_2O_2 para H_2O pela APX ocorre pela oxidação do ascorbato a produção de aldeído malônico (MDA), o qual pode ser regenerado pela MDA redutase (MDAR) usando NAD(P)H como equivalentes redutores. MDA pode espontaneamente dismutar a deidroascorbato. (APEL E HIRT, 2004).

A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca em plantas são cruciais para o desenvolvimento de novas cultivares de soja mais resistentes ao déficit hídrico. A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada para o estudo desses mecanismos de tolerância (SHINOZAKI E YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996, 1997).

Várias famílias de cinases podem afetar a resposta ao ABA (LEUNG et al, 1994, 1997; MEYER et al, 1994; LI E ASSMANN, 1996; SHEEN, 1998; MORI E MUTO, 1997; RODRIGUEZ et al, 1998; MUNNIK et al, 1999; ICHIMURA et al, 2000; LI et al, 2000; MIKOLAJCZYK et al, 2000). Nos eucariotos, as proteínas cinases estão envolvidas em aspectos chave que envolvem funções celulares como divisão, metabolismo e respostas a sinais externos. (GRIBSKOV, 1996). Algumas cinases da família SnRK (*SNF1 related kinases*), tem sido identificadas, em *Arabidopsis thaliana*, como participantes nas rotas de sinalização da resposta à seca, e podem estar envolvidas na ativação de fatores transcricionais na resposta ao ABA (MUSTILI et al, 2002; YOSHIDA et al, 2002; GUO et al, 2002). Esta família pode ser dividida em três grupos gênicos, SnRK 1, 2 e 3.

Baseado na ativação por ABA, a SnRK2 pode ser dividida em dois subgrupos: Um grupo composto por cinases ativadas por ABA e hiperosmose acentuado que inclui SnRK2-2, SnRK2-3, SnRK2-7, e SnRK2-8 e outro que é composto por cinases ativadas apenas pela hiperosmose, que incluem SnRK2-1, SnRK2-4, SnRK2-5, e SnRK2-10. Além disso, o gene SnRK2-6/SnRK2-E/OST1 demonstra ser ativado por uma via sinalização ABA-dependente, conduzindo ao fechamento estomatal (MUSTILLI et al, 2002; YOSHIDA et al, 2002), o que sugere que SnRK2-6 também esteja envolvido em uma via osmótica ABA-dependente. Poucos dados estão disponíveis em outros grupos de proteínas relacionadas à SNF1-cinases (SnRK2) presentes apenas em plantas (HRABAK et al, 2000); onde a proteína SnRK2-E / SnRK2-6 é ativada por desidratação (YOSHIDA et al, 2002).

Em *Arabidopsis*, o domínio regulatório C-terminal de SnRK2.6/OST1 é requerido para a sinalização do ABA e ao estresse osmótico. O domínio C-terminal é funcionalmente dividido em dois domínios, I e II. O domínio II é requerido apenas para ativação ABA-dependente da SnRK2.6/OST1 e tem um papel crítico no controle do fechamento estomático. Por outro lado, o domínio I é responsável pela ativação ABA-independente.

Diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar a expressão de genes em tecidos e células. Dentre esses métodos, a RT-PCR é um dos mais sensíveis e versáteis. Esta

técnica pode ser usada para determinar a presença ou ausência de transcritos, para estimar o nível de expressão e para clonar produtos de cDNA sem a necessidade da construção e seleção de bibliotecas de cDNA (SAMBROOK, 2001), e em particular, no caso de proteínas codificadas por famílias multigênicas (ORSEL, et al., 2002).

A RT-PCR, em teoria, é capaz de detectar a presença de uma única cópia de uma sequência na amostra de RNAm. Na prática, no entanto, este nível de sensibilidade está fora de alcance principalmente devido à ineficiência inerentes a primeira fase da técnica, a conversão do RNA em cDNA (SAMBROOK, 2001). Assim, o PCR em Tempo Real torna-se uma ferramenta simples e de grande utilidade para estudos de expressão gênica, possibilitando verificar não só a presença de transcritos como também fornecer dados do nível de expressão relativa do gene.

O objetivo deste trabalho foi analisar o nível de expressão de alguns genes da segunda família de cinases de SnRKs, envolvidos na tolerância a deficiência hídrica, em dois genótipos de soja, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Adicionalmente, avaliar o déficit hídrico como agente de estresse oxidativo através da determinação dos níveis de peroxidação lipídica e da atividade de enzimas antioxidantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Genético e Delineamento Experimental

A escolha dos genótipos de soja foi baseada em resultados de experimentos anteriores, em que se constatou que os cultivares de soja Embrapa 48 (FARIAS *et al.*, 1999; NEUMAIER *et al.*, 2001; OYA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2008) e BR-16 (NEPOMUCENO *et al.*, 1994; NEUMAIER E NEPOMUCENO, 1994; FARIAS *et al.*, 1995; NEUMAIER *et al.*, 1995; 1997; 2001), apresentavam respostas contrastantes quando submetidos a períodos de déficit hídrico. A cultivar BR-48 é uma cultivar convencional com alto potencial e boa estabilidade produtiva. Possui boa ramificação lateral e tolerância a seca na fase de planta adulta, enquanto que a BR-16, também um cultivar convencional, mostra-se bastante sensível à deficiência hídrica.

A semeadura do experimento foi realizada em vasos de PVC, em casa-de-vegetação. Foram utilizados 6,5 kg de substrato/vaso com a composição de 50% vermiculita e 50% de areia grossa lavada. Para indução do déficit hídrico, as plantas foram submetidas a três níveis de potencial hídrico (ψ_{ma}): -3,0Mpa, -1,5Mpa e -0,5Mpa, correspondendo aos tratamentos estressado, pouco estressado e não estressado (irrigado), respectivamente. Esses valores foram mantidos por meio de controle diário da pressão osmótica. No interior da casa-de-vegetação, a temperatura foi mantida entre 23 e 28°C sem controle de umidade relativa do ambiente e do fotoperíodo. O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 3x2. Da semeadura até a imposição ao estresse, foram gastos 33 dias e as coletas das folhas foram feitas 7 e 10 dias após a condição de déficit hídrico.

2.2 Caracterização Fisiológica

2.2.1 Peroxidação Lipídica - Espécies Reativas de Oxigênio

A peroxidação lipídica foi quantificada através da determinação de aldeído malônico formado (MDA), segundo protocolo de Gomes Junior, 2006 e Hoedgs, 1999. Cinco discos

foliares de 1,4cm de diâmetro (250mg) foram triturados em nitrogênio líquido com polivinilpirolidônio (PVPP). Em seguida, foi adicionado 1,3mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 5 minutos. À quantidade de 250µL do extrato foi adicionado 1,0mL da solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (+TBA), e como controle negativo outros 250µL do extrato foram adicionados a 1,0mL da solução de TCA 20% sem ácido tiobarbitúrico (-TBA). As amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas a 95°C, por 30 minutos, e a reação foi paralisada no gelo. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos. Foram realizadas leituras de absorbância a 400, 532 e 600nm, segundo protocolo de Hodges *et al.*, (1999). A concentração de MDA foi expressa em nmol g⁻¹ MS, segundo:
$$[(A-B/157000)*10^6]*2*2000*500]/MS,$$
 onde: $A=[(A_{532}+TBA)-A_{600}+TBA)]-[(A_{532}-TBA)-(A_{600}-TBA)]$; $B=[(A_{440}+TBA)-(A_{600}+TBA)*0,057]$ e o coeficiente de absorvidade para o MDA é de 157 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.2.2 Efeito do Estresse Hídrico sobre a atividade de Enzimas do Sistema Antioxidativo

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades das peroxidases (POXs) e das superóxidos dismutases (SODs) foram obtidos pela trituração de 0,3g de tecido vegetal em N₂ líquido. Após a maceração foram adicionados 2mL de meio de homogeneização da filtração e centrifugados a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Os meios de homogeneização utilizados para as enzimas eram compostos de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (P/v) (PEIXOTO *et al.*, 1999).

A atividade das superóxido dismutases (SODs) foi determinada pela adição de 5µL do extrato enzimático foliar bruto a 295µL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de sódio 50mM, pH 7,8, metionina 13mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1mM e riboflavina 2µM (DEL LONGO *et al.*, 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15W,

mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A absorbância a 560nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por tempo igual, servindo como controle e em seguida, subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade das SODs define a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

A atividade das peroxidases no tecido foliar foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). A alíquota de 10µL do extrato enzimático diluído 1:20 foram adicionados a 740µL de uma mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 25mM, pH 6,8, pirogalol 20mM e H₂O₂ 20mM. O acréscimo na absorbância a 420nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo a atividade das POXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,47mM⁻¹cm⁻¹ (CHANCE e MAEHLEY, 1955) e o resultado expresso em µmol min⁻¹mg⁻¹proteína.

2.2.3 Determinação de Proteínas

A concentração de proteína total foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Fez-se a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi expressa em µg de BSA por mL de extrato (µg proteína mL⁻¹).

2.2.4 Análises Estatísticas

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores ± desvio padrão (média ± dp) obtidos através da análise de variância (ANOVA) e para a comparação

das médias obtidas, foi aplicado o teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os valores com 95% de significância ($p < 0,05$).

2.3 Análise da Expressão de Genes

2.3.1 Identificação de Sequências

As sequências de nucleotídeos referentes ao segundo grupo das SnRKs de *A. thaliana*, um total de 10 sequências, foram obtidas por consulta ao banco de sequências de DNA (Centro Nacional para Informações Biotecnológicas – NCBI) no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para a identificação das sequências de nucleotídeos referentes às SnRKs da soja (*Glycine max*) foi feita uma busca utilizando as sequências encontradas, através do algoritmo BLAST, no banco de dados genômicos da soja depositados no Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php?show=blast>) e posteriormente, o alinhamento das sequências utilizando o programa MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) com o objetivo de eliminar as sequências repetidas.

2.3.2 Desenhos dos Iniciadores

O desenho dos iniciadores (*primers*) foi realizado no programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) que foi especialmente designado para desenhar *primers* em experimentos de PCR em Tempo Real. Nesse programa foram estabelecidas algumas condições (Tabela 1) de forma a favorecer a funcionalidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados.

Tabela 1: Condições para o desenho de iniciadores obtidos pelo programa Primer Express.

CONDIÇÕES PARA O DESENHO DOS INICIADORES	
Tamanho do amplicom	50-150 pb
Tamanho do Iniciador	17 a 28 pb

T _m	53 a 62° C
Porcentagem de CG	30 a 80

2.3.3 Extração de RNA

Para a extração de RNA foi utilizada a metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987) utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Antes de descongelar, o triturado (100 mg de tecido fresco pulverizado em cadinhos com nitrogênio líquido) recebe 1 mL de reagente Trizol sendo então transferido para microtubo (1,5mL). A proporção deve ser 50 a 100mg de amostra para 1 mL de TRIZOL. Após esse processo a solução é centrifugada (12.000xg por 10 minutos a 2 a 8°C). A fase aquosa é cuidadosamente transferida para um tubo novo, incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C) lavada com clorofórmio (200µL) sob agitação intensa por 15 segundos e posterior incubação em temperatura ambiente por 5 minutos seguido de nova centrifugação (12.000xg por 15 minutos a 2 a 8°C). Visualizaram-se três fases: inferior orgânica (avermelhada contendo fenol), interfase e superior aquosa e mais clara.

A fase aquosa foi transferida novamente para um microtubo limpo e o RNA total foi precipitado com isopropanol (0,5 ml de isopropanol por mL de TRIZOL usado). Em seguida à adição do isopropanol seguiu-se com centrifugação (12.000g por 10 min, 4° C). O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% e seco a 37°C por 10 minutos. O RNA total foi ressuspensão em 50 µL de água livre de RNase. Os estoques de RNA foram mantidos a -80°C.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade do RNA foi analisada com base na relação A260/A280 em que valores maiores que 1,8 indicam boa qualidade de RNA extraído.

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1%) contendo tampão TBE 1x. A cuba foi tratada com RNase Away (Invitrogen™ Life Technologies). Ao gel, foi adicionado 2 µL de RNA com 2 µL de tampão de amostra (sacarose 40% e azul de bromofenol). A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TBE (1x) (Tris/ácido bórico/EDTA) durante 40 minutos a 80v.

Para a remoção do conteúdo genômico de DNA do RNA total foi adicionado em um tubo de 0,6 mL, 8 µL de RNA total, 1 µL de tampão de reação 10x e 1 µL de DNase I (1U/µl) (Sigma). O volume foi completado para 10 µL com água tratada DEPC. A reação

foi incubada à 37° C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1 µL de EDTA 25mM (EDTA é um inibidor de exonuclease, DNase I 5'exonuclease). Posteriormente, a reação foi aquecida a 65° C por 15 minutos para inativar a DNase I e colocada no gelo por 1 minuto. Assim, o RNA tratado foi utilizado diretamente para transcriptase reversa.

2.3.4 Síntese de DNA Fita Simples

A reação de RT-PCR foi realizada com a utilização de amostras de RNA total. Para a síntese da 1ª fita adicionou-se 1µL de oligo-dT (10µM) e 1µL de dNTPs (10mM) a um tubo de 1,5 mL junto a 8µL de RNA total tratado. Logo após a mistura foi aquecida a 70° C por 10 minutos e colocada no gelo. Posteriormente foram adicionados ao tubo 6µL de tampão primeira fita (5x), 4µL dNTP's (2,5mM), 2µL DTT (0,1M), 2µL enzima Transcriptase reversa (Moloney Murine Leukemia Virus- M-MLV) (Invitrogen – Life Technologies) e 4µL H2O DEPC, totalizando um volume final de 30µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. O produto da reação foi em seguida armazenado a 4°C e usado posteriormente para as reações de PCR em tempo real.

2.3.5 PCR em Tempo Real

2.3.5.1 Validação

Com o objetivo de validar os iniciadores escolhidos para a reação de PCR em tempo real, uma curva de eficiência foi elaborada com diferentes concentrações de cDNA (1x, 5x, 25x e 125x). A amplificação se realizou utilizando Sybr Green como fluoróforo. A curva de eficiência foi feita com diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de *primers* (Tabela 2), visando estabelecer a concentração ideal para a reação de quantificação relativa. As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em triplicatas (biológicas e técnicas) e dois controles endógenos, o gene rRNA 18S (nº de acesso no Genbank XO2623.1) e o gene β-actina (nº de acesso NM_131031).

Tabela 2. Seqüências dos *primers forward* e *reverse* usado no PCR em tempo real.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Eficiência
OST 1	TCTTTCCCAAACCAATACACGC	AGAAGTGAAGAGGAAGAGGAGAGAAG	90,32
SnRK2.3	TGCCAGGATTCTTGTTTGCA	AGAGGAATGGTAACAAGGAGTATGTGT	90,58
SnRK2.4	ATGTCCAAATCTTCAGTTAGCTTCT	GAGTACGCTGAGGAGGTTTGATC	90,12
β -actina	AAGAGATGGCCACGGCTGCT	TCGCTCCAACCGACTGCTGT	93,62
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	94,16

A ferramenta geNorm (Visual Basic Application - VBA), disponível online (<http://medgen.urgent.be/~jvdesomp/genorm/> acesso em 18/06/2009), foi utilizada para calcular quais dos genes controle testados foram os mais estáveis no grupo de amostras, demonstrando ser o da β -actina melhor controle endógeno, com desvio padrão médio de 0,088511.

A partir da curva de eficiência obteve-se o valor da inclinação da reta (*slope*) e a partir deste valor, calculou-se a eficiência de amplificação na reação de acordo com a fórmula $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$. A eficiência tanto do gene alvo quanto do controle endógeno apresentaram-se de maneira similar e acima de 90% (Tabela 2).

O controle negativo foi realizado adicionando-se água livre de RNase ao invés de cDNA. Tal procedimento foi adotado para a certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação.

2.3.5.2 Quantificação relativa

A quantificação relativa, utilizando a metodologia $\Delta\Delta C_t$, foi realizada com três repetições biológicas de cDNA de cada variedade nos três níveis de potencial hídrico. As reações de PCR em Tempo Real fizeram-se com a diluição de 5x, ou seja, o mesmo protocolo para a curva de eficiência.

Nas reações de quantificação relativa foram utilizados os mesmos controles endógenos e parâmetros descritos para a curva de eficiência.

Todas as análises de expressão gênica foram feitas utilizando-se como calibrador a expressão dos genótipos irrigados das duas variedades.

Para calcular o nível de expressão de um gene de interesse são considerados: ΔCt (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct$ (amostra) – Ct (controle endógeno) e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). A partir daí calcula-se o nível de expressão pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.3.5.3 Curva de dissociação

Após a quantificação relativa obteve-se uma curva de dissociação em que se verificou a formação de dímeros de *primers*, amplificações inespecíficas e contaminações. Na curva de dissociação, a temperatura foi reduzida gradativamente. A reação foi incubada a 95° C por 15 segundos, 60° C por 30 segundos e 95° C por mais 15 segundos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Peroxidação de lipídios

Observou-se que na ausência de estresse hídrico as plantas tolerantes (Embrapa 48) apresentaram maiores níveis de MDA (Figura 1). Moldes (2006), trabalhando com duas variedades de soja para a resistência ao herbicida glifosato, encontrou maior produção de MDA na planta resistente. Outro trabalho, com arroz, mostrou que o genótipo resistente ao alumínio teve maior produção de MDA, independente da presença do estresse (JÚNIOR, 2007). Esse fato supõe que a resistência ao estresse hídrico da variedade BR-48 possa estar relacionada ao acionamento de outras rotas fisiológicas e transcricionais que aumentam essa resistência e que não se relaciona apenas à produção de reativos de oxigênio (MDA).

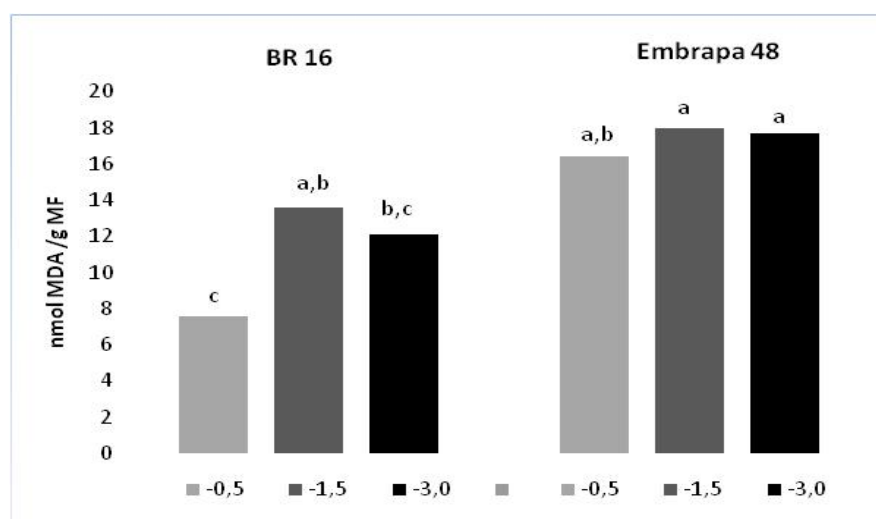


Figura 1: Efeito da deficiência hídrica sobre a peroxidação de lipídios, expressa em nmol MDA g massa fresca⁻¹ de folhas das variedades BR-16 e Embrapa 48, em três níveis de potencial hídrico (ψ_{ma}) -3,0 Mpa, -1,5 Mpa e -0,5 Mpa. Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

A maior concentração de MDA na Embrapa 48 pode ser explicada, também, pela menor atividade da dismutase do superóxido (SOD) e de enzimas envolvidas diretamente na eliminação de H_2O_2 , tais como, peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR). Parece evidente que a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, tais como o H_2O_2 , depende da atividade de várias enzimas antioxidativas, funcionalmente inter-relacionadas, envolvidas na remoção destes EROs (LEE e LEE, 2000).

Comparativamente, o genótipo BR-16 apresentou estresse oxidativo com o aumento da produção de MDA, quando houve imposição do estresse hídrico, sugerindo e comprovando assim que, este genótipo seja mais susceptível a deficiência hídrica.

Quando comparamos o aumento dos níveis de peroxidação lipídica entre os genótipos, constatamos que para o genótipo BR-16 o aumento foi cerca de 80% enquanto o genótipo Embrapa 48 de apenas 9%, demonstrando assim, que a imposição do estresse hídrico faz aumentar os níveis de oxidação lipídica.

Adicionalmente, o MDA é somente uma forma de estresse oxidativo e, como outras formas não foram avaliadas, é recomendada cautela na interpretação de dados de MDA isoladamente.

3.2 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Alguns trabalhos relacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidantes com o mecanismo de defesa, degradando espécies reativas de oxigênio e favorecendo a diminuição da peroxidação lipídica (AZIZ e LARHER, 1998; PEIXOTO et al., 1999; VERMA e DUBEY, 2003).

Sob estresse hídrico severo ($\Psi = -3,0$ MPa), observa-se que há maior atividade da SOD no genótipo sensível a seca (110%) (Figura 2). Na ausência ou em menores níveis de estresse as diferenças não foram significativas. Este resultado sugere que a atividade de superóxido dismutase nas reações fotoquímicas podem ser maiores no genótipo sensível pelo fato deste genótipo apresentar menor capacidade de drenar o excesso do poder redutor,

como a fotorespiração, o transporte cíclico de elétrons nos tilacóides, na síntese e exportação de malato do cloroplasto, entre outros, ou uma maior utilização destes mecanismos antioxidativos no genótipo resistente (SCANDALIOS, 1993).

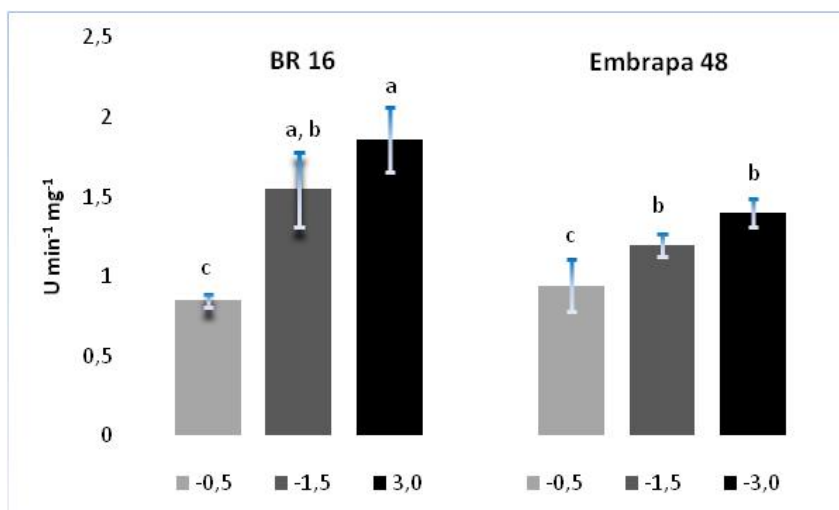


Figura 2: Efeito do déficit hídrico na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), em dois genótipos de soja, expressa em concentração em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína de amostra de folhas das variedades BR-16 e Embrapa 48, em três níveis de potencial hídrico (ψ_{ma}) -3,0Mpa, -1,5Mpa e -0,5Mpa. Os valores representam a média de três repetições biológicas e três técnicas. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para a enzima peroxidase (POX), os resultados foram semelhantes, sendo que o aumento no genótipo BR-16, para os potenciais hídrico -1,5MPa e -3,0MPa, foi de 77% e 105%, respectivamente, enquanto que, no genótipo resistente a atividade foi de 23% e 45% para os mesmos tratamentos (Figura 3).

Sob os diferentes níveis de estresse hídrico analisados, observamos maior atividade da POX no genótipo sensível. A maior atividade dessa enzima seria explicada pela maior presença de peróxido de hidrogênio, o que por sua vez, indicaria maior estresse oxidativo. POX é considerada uma enzima de estresse ambiental, assim, há um aumento desordenado

na taxa respiratória para a diminuição das espécies reativas de oxigênio, removendo átomos de hidrogênio dos grupos alcoóis, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água protegendo, assim os tecidos (SALISBURY e ROSS, 1992).

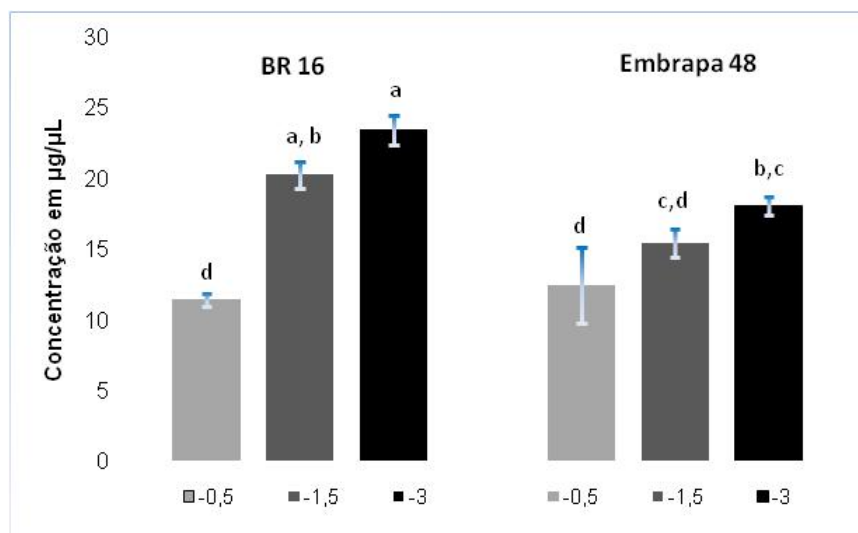


Figura 3: Efeito do déficit hídrico na atividade da enzima peroxidase total, em dois genótipos de soja, expressa em Concentração em µg/µL de amostra de folhas das variedades BR-16 e Embrapa 48, em três níveis de potencial hídrico (ψ_{ma}) -3,0Mpa, -1,5Mpa e -0,5Mpa. Os valores representam a média de três repetições biológicas e três técnicas. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Neumaier (2001) relatou maior desidratação no genótipo BR-16, em comparação com o genótipo Embrapa 48 sob estresse. Os resultados obtidos com a atividade enzimática permitiu sugerir que esta maior desidratação no genótipo sensível sob déficit hídrico se refletiu em maiores níveis da atividade da SOD e POX, indicando um maior nível de estresse oxidativo.

Comparando com os resultados da peroxidação lipídica, pode-se verificar que, apesar do Embrapa 48 ter apresentado maior teor de MDA, que provavelmente esteja aumentada por vias naturais, haja vista que a planta controle (sem estresse hídrico) também apresentou grande acúmulo de MDA, a atividade enzimática não foi superior da planta sem

estresse, supondo assim que, além das enzimas SOD e POX atuarem na defesa contra EROs, outras vias podem ser recrutadas visando diminuir os danos oxidativos. A extensão do estresse oxidativo em células é determinada pelas quantidades de superóxido, H_2O_2 e radicais hidroxila. Entretanto, o balanço das atividades de SOD, APX, POX e CAT é crucial para a supressão dos níveis tóxicos de ERO nas células. Mudanças no balanço das enzimas detoxificadoras de EROs induzem mecanismos compensatórios. Por exemplo, quando a atividade da catalase é reduzida em plantas, enzimas protetoras como APX e GPX são expressas em maiores quantidades, em efeito compensatório (APEL e HIRT, 2004).

As plantas podem desenvolver graus de resistência diversos, variando de organismo para organismo. Essa resistência normalmente envolve várias vias metabólicas que ainda não foram totalmente elucidadas. Um dos tipos é o estresse “evitado” (*avoidance stress*), no qual a planta é capaz de excluir o estresse, parcialmente ou completamente, com a formação de uma barreira física, química ou metabólica, que elimina o estresse. Outro tipo é a tolerância ao estresse, onde a planta é capaz de gerar resistência a esse, podendo prevenir, diminuir ou reparar os estresses, mas sem excluí-los (LEVITT, 1972).

Poucos estudos têm comparado as diferenças potenciais nas respostas quanto às diferentes taxas de imposição do déficit hídrico, mas estes mostram diferenças marcantes quanto à expressão diferencial de genes (HAZEN et al., 2005; TALAME et al., 2007).

A maior tolerância ao estresse hídrico, observada em alguns genótipos de soja, pode estar relacionada com a melhor qualidade fisiológica de suas sementes (BRACCINI et al., 1996; 1998). Segundo Braccini et al. (1996), as sementes de soja quando submetidas ao estresse hídrico, geralmente, apresentam redução na sua percentagem de germinação, sendo essa redução maior para os genótipos que apresentam menor qualidade fisiológica inicial de suas sementes. No entanto, podem ocorrer variações como ocorre com a variedade de soja Embrapa 48 que, notoriamente, apresenta baixa qualidade fisiológica, germinação e vigor de sementes. Porém, quando submetida a condições de estresse no campo é considerada uma das mais tolerantes ao déficit hídrico (FARIAS et al., 1999; NEUMAIER et al., 2001; OYA et al., 2004).

3.3 PCR em Tempo Real

A análise do nível de expressão dos genes OST1, SnRK2.2 e SnRK2.3 no genótipo BR-16, indicou expressão diferencial. Esses genes estão provavelmente associados a processos de resposta da planta ao estresse hídrico (Figura 4). Muitos genes induzidos pelo déficit hídrico provavelmente promovem aumento da tolerância celular à desidratação, aumento das funções de proteção do citoplasma, organelas e membranas celulares, alterações do potencial celular osmótico, aumento na absorção de água (e.g. aquaporins), aumento no controle e no acúmulo de íons e maior regulação da expressão de outros genes (BRAY, 1993, 1997; BOHNERT, et al., 1995; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Entretanto, isso não ocorreu com o genótipo resistente, supondo assim, que os mecanismos genéticos para essa característica, neste genótipo, não esteja interligado ao aumento da expressão dos genes analisados com o aumento da resistência

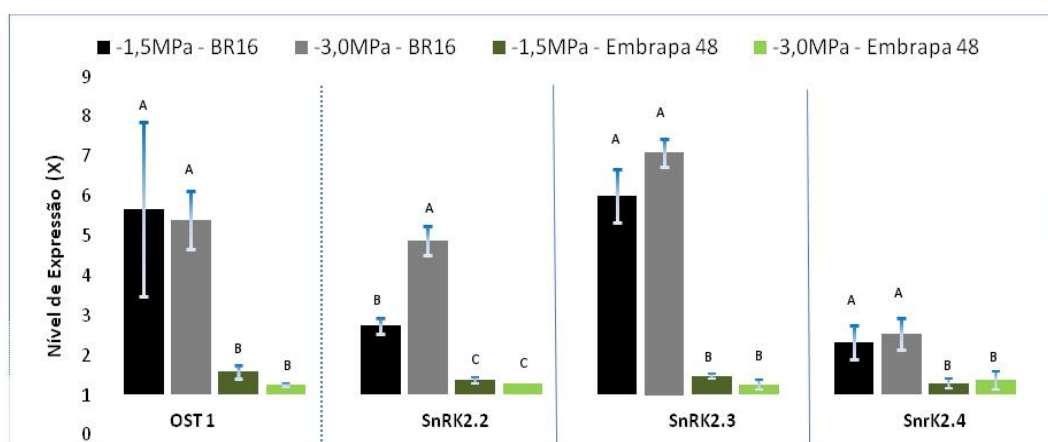


Figura 4: Nível de expressão dos genes no genótipo BR-16 e Embrapa 48 nos dois potenciais hídricos $\psi_{ma} = -1,5\text{MPa}$ e $-3,0\text{MPa}$. A barra azul significa o desvio padrão das amostras. Os valores representam a média de três repetições biológicas e três técnicas. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

O gene OST1 apresentou alta expressão nos diferentes potenciais hídricos (mais de 5x) no genótipo sensível (BR-16), demonstrando que, na soja, esse gene também tem sua expressão aumentada, como ocorre em *A. thaliana* em déficit hídrico. Plantas com super-expressão da OST1, em *A. thaliana*, aumentam a tolerância à seca, conjuntamente com o aumento da expressão de genes de resposta ao estresse, como fatores transcricionais da classe HD-ZIP (UMEZAWA et al., 2004).

Entretanto, este gene não é o responsável pelo aumento da tolerância ao estresse imposto no genótipo Embrapa 48, haja vista que, não houve aumento significativo na expressão deste gene, supondo assim que esse genótipo possui outros fatores genéticos que fazem com que a planta resista à perda de água, e que neste caso, não esteja relacionado à expressão de genes da família 2 de SnRK.

O gene OST1 atua como um regulador central do fechamento estomático em resposta ao ABA (LI e ASSMANN, 1996; LI et al., 2000; MUSTILLI et al., 2002; YOSHIDA et al., 2002), sendo a atividade da OST1 proporcional ao estresse hídrico imposto. Considerando os resultados de Neumaier et al., (2001), pode-se supor que os estômatos fecham-se mais lentamente no genótipo sensível quando comparado ao genótipo tolerante. Isso pode significar uma menor síntese e/ou transporte de ABA neste genótipo, fazendo com que o fechamento estomático seja menos efetivo. Os resultados com a maior expressão de OST1 no genótipo sensível podem sugerir que haja algum outro mecanismo, além do ABA, de ação compensatória, que tenta reduzir a desidratação, levando a maior expressão desse gene, e, conseqüentemente, maior produção de peróxido de hidrogênio e inativação do canal de influxo de potássio da célula guarda.

A expressão do gene SnRK2.3 foi significativamente a maior de todos os genes (mais de 7x para o $\psi_{ma} = -1,5\text{MPa}$), demonstrando assim, sua importância dentro da segunda família de SnRK para a resposta ao déficit hídrico. Em outros trabalhos, com *A. thaliana*, havia sido identificado membros do grupo SnRK2 que atua como regulador central do fechamento estomático em resposta ao ABA e à ativação, por uma via sinalização ABA-dependente, conduzindo ao fechamento estomatal (LI e ASSMANN, 1996; LI et al., 2000; MUSTILLI et al., 2002; YOSHIDA et al., 2002).

Infere-se que esta família de cinases e pontualmente os genes aqui citados, apresenta importância no aumento da tolerância à seca na soja, pois o genótipo sensível ao estresse hídrico teve expressão gênica aumentada. Toda expressão fenotípica em plantas submetidas

ao déficit hídrico está relacionada com a expressão gênica e sua interação com o ambiente. Quando água é perdida pela célula, processos regulatórios são iniciados e o metabolismo celular é ajustado às novas condições celulares (BRAY, 1997). Simultaneamente, inibição no crescimento e alterações no desenvolvimento começam a ocorrer, resultando em mudanças adicionais na expressão gênica (BRAY, 1993). Muitos genes induzidos pelo déficit hídrico provavelmente promovem aumento da tolerância celular à desidratação. Entre estes mecanismos podemos citar o aumento das funções de proteção do citoplasma, organelas e membranas celulares, alterações do potencial celular osmótico, aumento na absorção de água (e.g. aquaporinas), aumento no controle e no acúmulo de íons e maior regulação da expressão de outros genes (BRAY, 1993, 1997; BOHNERT, et al., 1995; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

O desenvolvimento de cultivares de soja com elevada expressão destes genes, e a identificação de outros genes responsáveis pela resistência a perda de água, como ocorre no genótipo Embrapa 48, pode ser uma opção para a viabilização da produção de soja em áreas com deficiência hídrica. Da mesma forma, pode ser um caminho viável para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao estresse hídrico.

4. CONCLUSÕES

Os dois genótipos analisados respondem de maneiras diferentes a imposição do estresse hídrico tanto fisiologicamente, quanto na expressão de genes.

Três genes estudados (OST1, SnRK2.2 e SnRK2.3) tiveram o nível de expressão aumentado na condição de estresse hídrico para o genótipo sensível (BR 16).

A tolerância do genótipo Embrapa 48 não se relaciona a expressão dos genes, nem tão pouco com o aumento da atividade de enzimas antioxidativas analisados. Isso indica a necessidade de compreendermos melhor os processos bioquímicos, fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância desse genótipo ao déficit hídrico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Relative Quantification of Gene Expression: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, **Applied Biosystems User Bulletin #2**, 1997.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.
- ATKIN, O.K; MACHEREL, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. **Annals of Botany**, p. 1-19, 2008.
- AZIZ, A.; LARHER, F. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassic nappus* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 153, n. 5/6, p. 754-762, 1998.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, p. 23-58, 2005.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and a assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, p.1099-1111, 1995.
- BRACCINI, A.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietileno glicol. **Rev. Bras. Sementes**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 10-16, 1996.
- BRACCINI, A.L. Influência do potencial hídrico induzido por polietilenoglicol na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Pesq. Agropecu. Bras.**, Brasília, v. 33, n. 9, p. 1451-1459, 1998.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1035-1040. 1993.
- BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 48-54. 1997.
- BRAY, E. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n.407, 2004.
- CALBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-495, 1985.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: sexto levantamento**, março 2008. Brasília, 30f. 2008.
- CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture- not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science, Kidlington**, v. 5, p. 187-188, 2000.

- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLES, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1023-1028, 1993.
- FARIAS, J.R.B. **Caracterização das respostas da cultura da soja aos elementos do clima**. Resultados de pesquisa da Embrapa Soja. Londrina: Embrapa Soja, 1999.
- FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Efeito da variação diária da umidade do solo sobre a fotossíntese e resistência estomática da soja. In Sociedade Brasileira Agrometeorologia, 9, ed, **Anais. Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, v. 9. Campina Grande, PB, p. 68-70. 1995.
- FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **Agrianual**: anuário para a agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. p.148-156.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, A.R. Antioxidante metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1330-1337. 2006.
- GRIBSKOV, M.; VERETNIK, S. Identification of sequence pattern with profile analysis. **Methods Enzymol.**, v. 266, p. 198–212. 1996.
- GUO, Y.; XIONG, L.; SONG, C.P.; GONG, D.; HALFTER, U.; ZHU, J.K. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signalling in Arabidopsis. **Developmental Cell**, v. 3, p. 233-244. 2002.
- HAZEN, S.P.; PATHAN, M.S.; SANCHEZ, A. BAXTER, I.; DUNN, M.; ESTES, B.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; KREPS, J.A.; NGUYEN, H.T. Expression profiling of rice segregation for drought tolerance QTLs using a rice genome array. **Functional and Integrative Genomics**, v. 5, p. 104-116, 2005.
- HODGES, D.M.; DELOMG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assays for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611. 1999.
- Hrabak, E.M. 2000. Calcium-dependent protein kinases and their relatives. *Adv. Bot. Res.* 32:185-223
- ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; YOSHIDA, R.; YUASA, T.; SHINOZAKI, K. Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. **Plant Journal**, v.24, p. 655–665. 2000.
- JÚNIOR, E.M.F. **Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz, na presença de alumínio**. 55f. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.
- LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871-885, 2002.
- LEE, D. H.; LEE, C. B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, v. 159, p. 75-85, 2000.
- LEI, TONG; Z.; SHENGYAN, D. Effect of drought and rewatering on photosynthetic physiological characteristics of soybean. **Acta Ecologica Sinica**, v. 26, n.7, p. 2073-2178, 2006.

- LEUNG, J.; BOUVIER-DURAND, M.; MORRIS, .PC.; GUERRIER, D.; CHEFDOR, F.; GIRAUDAT, J. Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calciummodulated protein phosphatase. **Science**, v. 264, p. 1448–1452. 1994.
- LEVITT, J. Responses of plants to envoronmental stresses. New York: **Academic Press**, 697p. 1972.
- LI, J.; ASSMANN, S.M. An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. **Plant Cell**, v. 8, p. 2359-2368. 1996.
- LI, J.; WANG, X.Q.; WATSON, M.B.; ASSMANN, S.M. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. **Science**, v. 287, p. 300–303. 2000.
- LIMA, A.L.S.; DaMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R. LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* unde déficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.
- LIU, J.; ISHITANI, M.; HALFTER, U.; KIM, C.S.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt olerance. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 3730–3734. 2000.
- LIU, F.; JENSEN, C.R.; ANDERSEN, M.N. A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, p. 1245-1252, 2005.
- MEYER, K.; LEUBE, M.P.; GRILL, E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 264, p. 1452–1455. 1994.
- MIKOLAJCZYK, M.; AWOTUNDE, OS.; MUSZYNSKA, G.; KLESSIG, D.F.; DOBROWOLSKA, G. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. **Plant Cell**, v. 12, p. 165–178. 2000.
- MOLDES, C.A. **Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. 93f. Tese de doutorado em Ecologia Aplicada – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2006.
- MORI, I. C.; MUTO, S. **Absciscic Acid Activates a 48-Kilodalton Protein Kinase in Guard Cell Protoplasts**. *Plant Physiol.*, v.113, p. 833–839. 1997.
- MUNNIK, T.; LIGTERINK, W.; MESKIENE, I.; CALDERINI, O.; BEYERLY, J.; MUSGRAVE, A.; HIRT, H. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. **Plant Journal**, v. 20, p. 381–388. 1999.
- MUSTILLI, AC.; MERLOT, S.; VAVASSEUR, A.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J. Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. **Plant Cell**, v. 14, p. 3089-3099. 2002.
- NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N. (1994). **Efeitos da disponibilidade hídrica no solo sobre a cultura da soja**. In EMBRAPA-CNPSO, ed, Ata - Documentos 72. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 15. Londrina, PR, p. 42-43. 1994.
- NEUMAIER, N. O. **Bases agronômicas e fisiológicas das respostas da soja à disponibilidade hídrica**. In: EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Resultados de pesquisa da Embrapa Soja: ecofisiologia e biologia molecular. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 8-12. 2001.

- NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO A. L. Índice de tolerância à seca em quatro cultivares de soja. *In* Sociedade Brasileira de Agrometeorologia, ed, Anais. **Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, v. 9, Campina Grande, PB, p. 80-82. 1995.
- NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Water management. *In* FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, ed, Tropical soybean: Improvement and production. **FAO - Plant Production and Protection Series**, v. 27, Rome, Italy, p. 153-160. 1994.
- OHASHI, Y.; NAKAYAMA, H.; SANEOKA, H.; FUJITA, K. Effects of drought stress on photosynthetic gas Exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. **Biologia Plantarum**, v. 50, p. 138-141. 2006.
- ORSEL, M.; FILLEUR, S.; FRAISIER, V.; DANIEL-VEDELE, F. Nitrate transport in plants: which gene and which control? **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.825-833. 2002.
- OYA, T. et al. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars. **Plant Prod. Sci.**, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 129-137, 2004.
- PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.2, 2007.
- PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R. Al effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137-143, 1999.
- QUEIROZ, C.G.S; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.L; MAGALHÃES, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in roots of (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biol. Plant.** 41:403-413. 1998.
- RODRIGUEZ, P.L.; BENNING, G.; GRILL, E. ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. **FEBS Letters**, v. 421, p. 185–190. 1998.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**, 4. ed. Belmont, CA: Wadsworth Publishing,. 682p. 1992.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. *In*: (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.
- SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 296-302, 2007.
- SHAO, H.; JIANG, S.; LI, F.; CHU, L.; ZHAO, C.; SHAO, M.; ZHAO, X.; LI, F. Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. **Biointerfaces**, v. 54, p. 33-36, 2007.
- SHEEN, J. Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 95, p. 975–980. 1998.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiol.** 115: 327-334, 1997.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 161-167, 1996.
- SMIRNOFF, N.; BRYANT, J.A. DREB takes the stress out of growing up. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 229-230, 1999.

- STUHFAUTH, T.; SCHEUERMANN, R.; FOCK, H.P. Light energy dissipation under water stress conditions. **Plant Physiology**, v. 92, p. 1053-1061, 1990.
- TALAMÉ, V.; OZTURK, N.Z.; BOHNERT, H.J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 229–240. 2007.
- TEIXEIRA, L.R.; BRACCINI, A.L.; SPERANDIO, D. SCAPIM, A. SCHUSTER, I.; VIGANÓ, J. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse hídrico em substrato contendo polietileno glicol. **Acta. Sci. Agron**, v. 30, n.2, p. 217-223, 2008.
- UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; MARUYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 101, p. 17306–17311. 2004.
- VASELLATI, V.; OESTERHELD, D.; MEDAN, D.; LORETI, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, v. 88, p. 355-360, 2001.
- VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, p. 645-655, 2003.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Horticulturae**, v. 560, p. 285-292, 2001.
- YOSHIDA, R.; HOBBO, T.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, F.; ALONSO, J.; ECKER, J.R.; SHINOZAKI, K. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol**, v. 4, p. 1473–1483. 2002.