

ALAN ALVES PEREIRA

EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE GENES DA  
SUBFAMÍLIA HD-Zip I EM SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436e  
2010

Pereira, Alan Alves, 1981-  
Efeito do estresse hídrico na expressão de genes da  
subfamília HD-Zip 1 em soja [*Glycine max* (L.) Merrill] /  
Alan Alves Pereira. – Viçosa, MG, 2010.  
xi, 39f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Aluizio Borém.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 34-39.

1. Expressão gênica. 2. Estresse hídrico. 3. Soja -  
Resistência a seca. 4. *Glycine max*. 5. Reação em cadeia da  
polimerase. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

ALAN ALVES PEREIRA

EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE GENES DA  
SUBFAMÍLIA HD-Zip I EM SOJA [*Glycine max* (L.) Merrill]

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

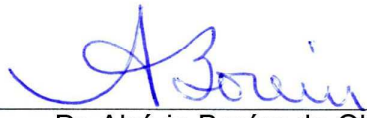
APROVADA: 05 de julho de 2010.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Co-Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. André Narvaes da Rocha  
Campos

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Eveline Teixeira Caixeta

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francis Julio Fagundes Lopes

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Aluizio Borém de Oliveira  
(Orientador)

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.  
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

*Cora Coralina*

*À minha mãe Elsie (in memoriam),  
que me ensinou os valores e  
princípios da minha vida.*

*Sei que aí onde você está,  
sempre continuará olhando  
por mim.*

**Dedico.**

*À minha esposa Aguida.*

*Você é um exemplo de inteligência,  
determinação e perseverança.*

*Obrigado por sempre me apoiar e  
estar presente em minhas decisões.*

*Sem você, jamais teria conseguido. Te Amo!*

**Ofereço.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos de minha vida.

À minha família: meu pai José Luiz e Ester, meus irmãos Alexandre, Ainho, John, Samara e minha esposa Aguida. Não tenho palavras para expressar o quanto os amo e o quão bom é ter vocês em minha vida.

Ao Paulo e Théa. Não sei nem como agradecer vocês. Vocês foram nossa família em Viçosa. Muito obrigado por tudo!!!

Ao Dr. Aluízio Borém pela oportunidade, apoio, confiança, ajuda e principalmente pela amizade. São pessoas como você em que eu me espelho para estudar e batalhar cada vez mais, para quem sabe um dia eu chegue a ser uma referência profissional como você é para mim.

Ao Dr. Marcelo Ehlers Loureiro por ter aberto as portas de seu laboratório, pela orientação e pelas correções na dissertação que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Aos professores da banca de defesa Dr. Aluízio Borém, Dr. André Narvaes da Rocha Campos, Dra. Eveline Teixeira Caixeta, Dr. Francis Julio Fagundes Lopes e Dr. Marcelo Ehlers Loureiro pelas sugestões e colaborações no enriquecimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Molecular: Aleson, Camilo, Carla, Danilo, Eduardo, Gisele, Gustavo, Ivan, Laiany, Renata, Rita, Sabrina e Valdir pela ajuda, conselhos, dedicação e companheirismo.

Ao Dr. André pela paciência, ensinamentos, amizade, sugestões, disposição em sempre ajudar e pelo exemplo de simplicidade, competência e inteligência.

Ao Dr. Francis pela amizade, dedicação, atenção e ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Mercês pela ajuda, paciência e convívio. Não sei o que seria do laboratório sem você!

À Dra. Michelle Graham pela simplicidade, amizade, oportunidade e ajuda. Você é um exemplo a ser seguido.

Aos amigos de Ames: Aldane, Ângela, Bruno, Bruna, Camila, Carine, Dani, Jana, Jeff, Juliana, Karla, Laura, Lucas, Marianna, Mônica, Nick, Paulo, Silvia e Victor. Obrigado pelos momentos de descontração, amizade, festas e churrascos. Vocês fizeram a gente se sentir um pouco mais perto do Brasil durante este um ano em Ames.

À Viviane e Everton, muito obrigado por tudo! Vocês são um casal abençoado por Deus.

À Loreta pela amizade, confiança e por toda ajuda. Você é uma pessoa muito especial!

À Rosi pela amizade, simplicidade, disposição no que precisasse e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rodrigo e Josi pela amizade e momentos de confraternização.

À Eva pela simplicidade, carinho e ajuda.

À secretária do programa de pós-graduação em Fitotecnia, Tatiani, pela ajuda e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Finalmente, a todos os meus familiares e amigos que mesmo à distância, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, seja incentivando ou torcendo por mim.

Muito Obrigado!!!

## BIOGRAFIA

ALAN ALVES PEREIRA, filho de José Luiz Alves Pereira e Elsie Alves Pereira (*in memoriam*), nasceu na cidade de Londrina, estado do Paraná, no dia 13 de julho de 1981. Em janeiro de 2001, iniciou o curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Filadélfia, UniFil, em Londrina-PR, graduando-se em dezembro de 2004. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da Embrapa Soja atuando no Laboratório de Biotecnologia do Solo. No ano de 2005, realizou o curso de Pós-Graduação, *Latu Sensu*, em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Estadual de Londrina, UEL, em Londrina-PR. No período de Março de 2006 até Julho de 2007 foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI) do CNPq, atuando no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja. Em agosto de 2008, iniciou o curso de Pós-Graduação, *Stricto Sensu*, em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa, UFV, em Viçosa-MG, defendendo o título de *Magister Scientiae* no dia 05 de julho de 2010.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura .....	3
2.1. A soja .....	3
2.2. Déficit hídrico .....	4
2.3. Características estruturais da família HD-Zip .....	6
2.4. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	9
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Montagem do Experimento .....	17
3.2. Seleção dos genes.....	18
3.3. Alinhamento das sequências .....	18
3.4. Desenho dos oligonucleotídeos .....	18
3.5. Extração de RNA .....	19
3.6. Síntese de cDNA.....	20
3.7. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	21
3.7.1. Curva de eficiência .....	21
3.7.2. Quantificação relativa .....	22
3.8. Identificação dos elementos cis-regulatórios.....	22
4. Resultados e Discussão .....	23
4.1. Seleção dos genes.....	23
4.2. Alinhamento das sequências .....	24
4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	26
4.3.1. Curva de eficiência .....	26
4.3.2. Quantificação relativa .....	27
4.4. Identificação dos elementos cis-regulatórios.....	31
5. Conclusões .....	33
6. Referências.....	34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fases da PCR. A detecção da PCR tradicional ocorre na fase platô, enquanto que na PCR em tempo real, a detecção ocorre na fase exponencial da reação. .... 10
- Figura 2. Terminologias comumente utilizadas na PCR em tempo real. .... 13
- Figura 3. A) Árvore filogenética das sequências em *A. thaliana* (ARIEL et al., 2007), B) Alinhamento das sequências de soja utilizando o programa Vector NTI® (*Invitrogen*). .... 25
- Figura 4. Alinhamento das sequências da subfamília HD-Zip I de soja. As sequências sublinhadas em vermelho foram escolhidas para desenho dos oligonucleotídeos. .... 26
- Figura 5. Nível de expressão do gene GmHB6. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16). .... 28
- Figura 6. Nível de expressão do gene GmHB13. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16). .... 29
- Figura 7. Nível de expressão do gene GmHB21. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16). .... 30
- Figura 8. Localização dos elementos cis-regulatórios relacionados à seca na região promotora dos genes GmHB6, GmHB13 e GmHB21. Os elementos cis-regulatórios identificados foram mapeados para permitir comparações entre as regiões promotoras dos genes. .... 31
- Figura 9. Identificação dos elementos cis-regulatórios dos genes A) GmHB6, B) GmHB13 e C) GmHB21. Os elementos cis-regulatórios relacionados à seca estão representados nos gráficos pela cor verde. .... 32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Funções dos membros das subfamílias de genes HD-Zip .....	8
Tabela 2. Identificação dos RNAs extraídos. ....	17
Tabela 3. Parâmetros utilizados para o desenho dos oligonucleotídeos. ....	18
Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados.....	19
Tabela 5. Sequência dos controles endógenos utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados. ....	19
Tabela 6. Sequência da Família HD-Zip em <i>A. thaliana</i> , tamanho e o código de acesso no NCBI. ....	23
Tabela 7. Sequência dos genes referente à Família HD-Zip em soja, tamanho e o código de acesso no Phytozome. ....	24

## RESUMO

PEREIRA, Alan Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010.  
**Efeito do estresse hídrico na expressão de genes da subfamília HD-Zip I em soja [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.  
Co-orientadores: Claudio Horst Bruckner e Marcelo Ehlers Loureiro.

Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes da subfamília HD-Zip I em soja sob condições de estresse hídrico, utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Foram avaliados trifólios de soja de genótipos tolerante (Embrapa 48) e suscetível a seca (BR-16) sob três níveis de déficit hídrico: ausência de estresse hídrico, estresse hídrico moderado (potencial hídrico foliar na antemanhã de -1,5 MPa) e estresse hídrico severo (potencial hídrico de -3,0 MPa). Dos três genes aqui estudados, o gene GmHB13 foi claramente induzido pelo déficit hídrico. O gene GmHB13 foi induzido no genótipo tolerante, e teve sua expressão reduzida no genótipo suscetível. Como a superexpressão de seu heterólogo em plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas aumenta a tolerância à seca, estas duas evidências, em conjunto, sugerem que este gene esteja contribuindo para a maior tolerância a seca do genótipo Embrapa 48. Por outro lado, a indução semelhante do gene GmHB21 em ambos os genótipos, sugere que este gene possa estar controlando a expressão de genes de aclimação a seca, não ligados diretamente ao mecanismo de tolerância. A repressão da expressão do gene GmHB6 no genótipo suscetível pode estar relacionada ao maior tempo de desidratação deste genótipo, visto que o mesmo atinge mais rapidamente o estresse hídrico severo. A redução no crescimento é então mais forte no genótipo suscetível, o que pode ser devido a maior redução da expressão do fator transcricional GmHB6, que teria um papel importante no controle da divisão celular. A análise dos promotores mostrou a presença de elementos cis-regulatórios relacionados ao estresse hídrico nos três genes estudados. Em conjunto, os resultados indicam que o gene GmHB13 como um forte candidato a participar no mecanismo de tolerância a seca em soja.

## ABSTRACT

PEREIRA, Alan Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010.  
**Effect of water stress on the gene expression of the HD-Zip I subfamily in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]**. Adviser: Aluizio Borém de Oliveira.  
Co-advisers: Claudio Horst Bruckner and Marcelo Ehlers Loureiro.

The objective of this work was to analyze the gene expression of the HD-Zip I subfamily, and its involvement in drought tolerance in soybean using the real time PCR (RT-qPCR) technique. Trifoliolate soybean leaves of drought tolerant (Embrapa 48) and susceptible (BR-16) genotypes were evaluated under three levels of water deficit: absence of water stress (mock), moderate water stress (-1.5 MPa), and severe water stress (-3.0 MPa). Among the three genes studied, GmHB13 was clearly induced by water stress. GmHB13 was induced only in the tolerant genotype, while it has reduced expression in the susceptible genotype. Super-expression of heterologous genes in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants increases drought tolerance. These observations suggest that this gene is contributing to a higher drought tolerance in the tolerant genotype. Moreover, the induction of gene, GmHB21 in both genotypes, suggests that this gene may be controlling the expression of drought acclimation genes not directly related to the mechanism of tolerance. The greatest reduction in expression of the GmHB6 gene in the susceptible genotype may be related to a longer dehydration of this genotype, whereas it quickly reaches the severe water stress. The growth reduction is stronger in the susceptible genotype, which may be due to greater reduction in the expression of transcription factor GmHB6, which would have an important role in controlling cell division. The analysis of the promoters showed the presence of cis-regulatory elements related to water stress in the three genes studied. Together, these results indicate the gene GmHB13 as a strong candidate to participate in the mechanism of drought tolerance in soybean.

## 1. Introdução

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é considerada uma das espécies cultivadas há mais tempo. Relatos da literatura chinesa sobre esta cultura datam de 2.500 anos a.C. A cultura da soja foi introduzida no Brasil em 1882 na Bahia, mas somente em 1940 o cultivo comercial do grão se estabeleceu na região sul do País, com considerável expansão das áreas de cultivo depois de 1960 (HUNGRIA et al., 2001).

Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial, sendo que a cada safra, são registrados incrementos, tanto em área plantada, quanto na quantidade produzida. O levantamento da Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento (CONAB), na safra 2009/2010, indicou um incremento na área plantada de 1,5 milhão de hectares, comparativamente à safra anterior. Em termos nacionais, houve um incremento na produção em 10,7 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

Com relação à estimativa de produtividade média na safra 2009/2010, devido ao comportamento climático que contribuiu para o bom desenvolvimento das lavouras, mesmo com excesso de chuvas e em consequência a alta umidade em algumas regiões, sobretudo no Paraná e em Mato Grosso, a produtividade está estimada em 2.920 quilos por hectare, a maior média já obtida em nível de País. A perda na produtividade da safra anterior, 2008/2009, se deve, sobretudo, à estiagem ocorrida na Região Sul e Estado do Mato Grosso do Sul. Esta ocorrência climática teve influência direta nas épocas de plantio e desenvolvimento da cultura. Vale salientar que uma boa parte da área plantada é de ciclo precoce e, por essa razão, as fases de florescimento e formação das vagens foram seriamente prejudicadas pela falta de chuva (CONAB, 2010).

A seca é um dos principais fatores responsáveis por perdas na produção brasileira de soja. Em situações de déficit hídrico, vários mecanismos são acionados pela planta para aumentar a tolerância à seca. Conhecer esses mecanismos e como é regulada a expressão dos genes relacionados com resposta à seca, é essencial na identificação de rotas metabólicas envolvidas nos processos de tolerância, e conseqüentemente, no desenvolvimento de

estratégias moleculares para obtenção de plantas mais adaptadas a essa condição.

Genes que respondem aos estresses abióticos em nível transcricional têm sido identificados em várias plantas e muitos deles têm papel importante na tolerância a esses estresses. Estudos funcionais envolvendo a caracterização molecular da função fisiológica destes genes em diferentes estágios da resposta ao estresse podem fornecer evidências de forma a identificar os genes envolvidos nesta resposta (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Uma importante aplicação desses estudos relata a identificação de genes estresse-induzidos que podem revelar funções essenciais ou importantes com efeito na tolerância ou nas reações de defesa contra a perda de água (TALAMÈ et al., 2007).

Os genes HD-Zip agem em processos de desenvolvimento, incluindo tecido vascular e o desenvolvimento do tricoma. Vários estudos sugerem que eles estejam envolvidos na mediação dos sinais externos que regulam o crescimento da planta (HENRIKSSON et al., 2005). A expressão dos genes da subfamília HD-Zip I é regulada por fatores ambientais como seca, altas temperaturas, estresse osmótico e é específico em diferentes tecidos e órgãos da planta (MEIJER et al., 2000; GAGO et al., 2002; OLSSON et al., 2004).

Uma vez determinada que a subfamília HD-Zip I está diretamente relacionada com estresse abiótico, o presente trabalho teve como objetivos: a) identificar a família HD-Zip em soja, b) estimar, por meio da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), os níveis de expressão de genes da subfamília HD-Zip I que supostamente estejam envolvidos no mecanismo de tolerância da soja sob situações de déficit hídrico, c) identificar os elementos cis-regulatórios na região promotora dos genes estudados.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. A soja

A soja é uma espécie autógama pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, gênero *Glycine* (SOY INFO CENTER, 2010). Apresenta-se como um organismo diplóide ( $2n=40$ ), derivado de um ancestral alotetraplóide, o que explica as altas taxas de duplicação em seu genoma (SHOEMAKER et al., 1996).

A soja é uma planta anual de caule ereto, com grande diversidade quanto ao ciclo de vida, variando de 70 dias para as mais precoces até 200 dias para as mais tardias. As variedades brasileiras de soja melhor se adaptam a temperaturas entre 20°C e 30°C; a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento está em torno de 30°C. O crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo a temperaturas menores ou iguais a 10°C. Temperaturas acima de 40°C têm efeito adverso na taxa de crescimento, provocam distúrbios na floração e diminuição da capacidade de retenção de vagens. Esses problemas se acentuam com a ocorrência de déficits hídricos (EMBRAPA, 2008).

Assim como a maioria das plantas, a soja, para florescer, é influenciada pela temperatura e pela duração do período luminoso, o fotoperíodo. A sensibilidade ao fotoperíodo é característica variável entre cultivares, ou seja, cada cultivar possui seu fotoperíodo crítico, acima do qual o florescimento é atrasado (FARIAS, et al., 2007). Por esta razão, a soja é considerada planta de dia curto e precisa de uma duração da noite maior que o dia para iniciar o processo de floração e frutificação no momento certo, isto é, após ter atingido o crescimento vegetativo adequado.

Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (glicose, frutose e sacarose, fibras e oligossacarídeos como rafinose e estaquiose) (EMBRAPA, 2010). Devido ao alto teor de proteínas e lipídios, a soja é, atualmente, responsável por cerca de 60% do suprimento de proteína de origem vegetal e 30% do óleo consumido no

mundo. Entretanto, novas perspectivas para maior utilização do óleo de soja na indústria, sob a forma de biodiesel, estão sendo consideradas.

## **2.2. Déficit hídrico**

O déficit hídrico ocorre quando o conteúdo de água de um tecido ou célula está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado maior de hidratação (TAIZ & ZEIGER, 2008).

A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta, atuando em, praticamente, todos os processos fisiológicos e bioquímicos. Desempenha a função de solvente, através do qual gases, minerais e outros solutos entram nas células e movem-se através da planta. Tem, ainda, papel importante na regulação térmica da planta, agindo tanto no resfriamento como na manutenção do calor (EMBRAPA, 2008).

Na soja, perdas causadas por estresses abióticos, como a seca, causam em média mais de 50% das perdas mundiais. Para apresentar um bom desempenho, a cultura da soja necessita além de um volume de água adequado, uma boa distribuição das chuvas ao longo do ciclo, satisfazendo suas necessidades, principalmente, durante as fases mais críticas.

Para tolerar o déficit hídrico, as plantas podem desenvolver mecanismos tanto para retardar como para tolerar a desidratação, pela manutenção da hidratação do tecido, e pela capacidade de funcionar enquanto desidratada, respectivamente (TAIZ & ZEIGER, 2008). Mecanismos para retardar a desidratação podem ser resultado da diminuição da perda de água por exemplo, pelo fechamento estomático, desenvolvimento de tricomas, redução da área foliar, enrolamento das folhas, queda prematura de folhas e flores ocasionando o abortamento de vagens, dentre outros. Alternativamente a planta pode maximizar a absorção de água pelo aumento do crescimento e profundidade do sistema radicular. Já os mecanismos de tolerância envolvem o ajuste osmótico e maior eficiência na remoção de espécies reativas de oxigênio, formadas como consequência da condição de estresse do metabolismo (BARNABÁS, et al. 2008; EMBRAPA, 2008; ISODA & WANG, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2008).

No âmbito mundial, a seca se posiciona no primeiro lugar de desastres naturais. Previsões ambientais sinalizam para o aumento do aquecimento global nas próximas décadas (SHAO et al., 2007). Neste cenário de alterações climáticas, as dificuldades para alimentar população mundial em crescimento acelerado, usando apenas tecnologias tradicionais, serão imensas. O desenvolvimento de cultivares mais tolerantes às adversidades climáticas, como por exemplo, à seca, será essencial. Portanto, a disponibilidade de novas ferramentas de pesquisa, nas áreas de ecofisiologia e biotecnologia vegetal possibilitam estudar e compreender com maior detalhe os processos envolvidos nas respostas fisiológicas e agrônômicas das culturas. Deste modo, compreender os mecanismos de tolerância das plantas ao déficit hídrico é de importância fundamental para definição de novas estratégias para aumentar a tolerância de plantas ao déficit hídrico (ATKIN & MACHEREL, 2009; BARTELS & SUNKAR, 2005; FARIAS, et al., 2007; STILLER et al., 2008).

A engenharia genética é uma ferramenta poderosa para melhorar a tolerância das plantas aos diferentes estresses. Recentemente, muitos estudos visam aumentar a tolerância aos estresses por transferência de genes. Os genes selecionados para a transformação são geralmente aqueles que codificam proteínas com funções específicas induzidas pelo estresse, que incluem proteínas aquaporina, enzimas chaves para a biossíntese de osmólitos, destoxificação e proteínas de transporte. Estes genes, individualmente apresentam algum impacto positivo na tolerância ao estresse. No entanto a resposta a seca é complexa, sendo improvável que esta resposta esteja sob controle de um único gene. Uma estratégia mais ampla e promissora pode ser o uso de fatores de transcrição, que possam regular a expressão de vários genes relacionados ao estresse abiótico (BARTELS & SUNKAR, 2005; CHINNUSAMY et al. 2005; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, et al., 2002).

A superexpressão de um fator de transcrição, ou ativador transcricional de uma sequência multigênica, cujos produtos direta ou indiretamente conferem aumento na tolerância ao estresse, se mostra uma estratégia promissora para fazer face aos efeitos da seca (BECK et al. 2007).

### 2.3. Características estruturais da família HD-Zip

A família de fatores de transcrição HD-Zip é única no reino vegetal. Essas proteínas apresentam uma combinação de um homeodomínio (HD) com um zíper de leucina (LZ). Os dois motivos estão presentes em fatores de transcrição de plantas. O HD é responsável pela ligação específica ao DNA, enquanto o LZ age como um motivo de dimerização. A família HD-Zip é classificada em quatro subfamílias (Subfamília HD-Zip I, Subfamília HD-Zip II, Subfamília HD-Zip III e Subfamília HD-Zip IV) de acordo com as características distintivas que incluem conservação do domínio de HD-Zip, estrutura gênica, motivos conservados e funções fisiológicas (ARIEL et al., 2007; SCHENA & DAVIS, 1992).

- **Subfamília HD-Zip I**

Em *Arabidopsis thaliana*, a subfamília I (HD-Zip I) é composta de dezessete membros (ATHB1/HAT5, ATHB3/HAT7, ATHB5-ATHB7, ATHB12, ATHB13, ATHB16, ATHB20-ATHB23, ATHB40, ATHB51-ATHB54). Os genes da subfamília HD-Zip I apresentam uma distribuição de íntron/exon comum de acordo com as relações filogenéticas (HENRIKSSON et al., 2005). As proteínas codificadas são de aproximadamente 35 kDa e exibem um HD altamente conservado e um LZ menos conservado (CHAN et al., 1998) e reconhecem uma sequência pseudo-palindrômica CAAT(A/T)ATTG (CHAN et al., 1998; PALENA et al., 2001). Somente dois membros desta subfamília, ATHB7 e ATHB12, são aparentemente incapazes de ligar ao DNA *in vitro* (JOHANNESSEN, et al., 2001).

A expressão dos genes desta família é regulada por fatores ambientais como seca, altas temperaturas, estresse osmótico e condições de iluminação, e é específico em diferentes tecidos e órgãos da planta (MEIJER et al., 2000; GAGO et al., 2002; OLSSON et al., 2004). Estudos de expressão com plantas transgênicas indicaram que ambos ATHB7 e ATHB12 tem sua expressão gênica induzida sob condições de déficit hídrico enquanto ATHB5 e ATHB6 tem sua expressão reduzida (LEE et al., 2001). Sob efeito deste estresse, os

genes da subfamília HD-Zip I comportam-se como reguladores do crescimento e desenvolvimento. O gene HaHB4 de girassol confere tolerância à seca em plantas transgênicas sob controle de promotores constitutivos ou induzidos por estresse (DEZAR et al., 2005a; DEZAR et al., 2005b), resultando, também na repressão da senescência mediada por etileno. A superexpressão de ATHB3, ATHB13, ATHB20 ou ATHB23 sugerem que estejam envolvidos na regulação do desenvolvimento de cotilédones e folha (HANSON et al., 2001; HENRIKSSON et al., 2005). O gene GhHB1, que codifica uma proteína HD-Zip I em algodão regula o desenvolvimento de raízes sob condições de estresse e sinalização de fitohormônios (NI et al., 2008).

- **Subfamília HD-Zip II**

A subfamília HD-Zip II é composta de nove membros (ATHB2/HAT4, ATHB4, HAT1-HAT3, HAT9, HAT14, HAT17, e HAT22). Apresentam HD e LZ altamente conservados, bem como os domínios adicionais: CPSCE (Cys, Pro, Ser, Cys, Glu) e uma sequência N-terminal consenso. As proteínas codificadas por esta subfamília formam dímeros que se ligam a sequências pseudopalindrômica CAAT(C/G)ATTG que difere dos membro da subfamília I apenas no nucleotídeo localizado no centro do sítio alvo. A expressão dos genes desta subfamília geralmente é regulada por condições de iluminação, em tecidos fotossintéticos e sua função está relacionada com o desenvolvimento da planta (ARIEL et al., 2007).

- **Subfamília HD-Zip III**

A Subfamília HD-Zip III é composta por cinco membros (ATHB8, ATHB9/PHAVOLUTA, ATHB14/PHABULOSA, ATHB15/CORONA e IFL1/REVOLUTA). O domínio de ligação desta subfamília tem quatro aminoácidos adicionais entre os domínios HD e LZ. A interação entre estas proteínas e o DNA é menos estudada em relação a outras subfamílias de HD-Zip. No entanto, GTAAT(G/C)ATTAC foi determinado ser a sequência para qual ATHB9 tem maior afinidade *in vitro* (SESSA et al., 1998).

Em geral, os membros desta subfamília são bem caracterizados funcionalmente como sendo reguladores de desenvolvimento do meristema apical, transporte de auxina (IFL1, ATHB9, ATHB14) ou, alternativamente, como reguladores de desenvolvimento vascular (ATHB8 e ATHB15). Todos os genes HD-Zip III são transcricionalmente e pós-transcricionalmente regulados, e seus mRNAs são alvos dos miR165 e miR166 (MALLORY et al., 2004). Em linhagens de plantas com alto níveis de miRNAs, os genes PHB, PHV e CNA foram regulados negativamente (KIM et al., 2005; WILLIAMS et al., 2005).

- **Subfamília HD-Zip IV**

A subfamília HD-Zip IV constitui uma grande subfamília de genes, ela é composta por 16 membros (ATHB10/GLABRA2, ATML1, ANL2, PDF2, HDG1-HDG5, HDG6/FWA e HDG7-HDG12). As proteínas codificadas por esta subfamília são semelhantes às proteínas HD-Zip III. Proteínas que pertencem a esta subfamília apresentam uma preferência na ligação em sequências alternativas. CATT(A/T)AATG foi identificado como sendo sequência alvo preferencial em girassol (*Helianthus annuus*) do membro HaHR1 (ARIEL et al., 2007).

Um resumo com as possíveis funções de cada membro das subfamílias de genes HD-Zip são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Funções dos membros das subfamílias de genes HD-Zip**

<b>Subfamília</b>	<b>Funções</b>
HD-Zip I	Resposta a estresse abiótico; Resposta ao ABA.
HD-Zip II	Resposta a condições de iluminação; Resposta a auxina.
HD-Zip III	Embriogênese; Regulação meristemática; Desenvolvimento do sistema vascular; Transporte de auxina.
HD-Zip IV	Diferenciação celular; Formação de tricomas; Desenvolvimento de raiz.

O número de membros que constituem as quatro subfamílias de HD-Zip é variável e depende de cada espécie. Porém, estes números não diferem significativamente nas plantas cujos genomas foram completamente sequenciado (MEIJER et al., 2000). Proteínas HD-Zip têm sido bem estudadas nos últimos anos e estudos funcionais têm demonstrado que cada uma das proteínas HD-Zip participa em vias de transdução de sinal alternativa. No entanto, muitas perguntas ainda estão sem resposta.

#### **2.4. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)**

O advento de técnicas moleculares como PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), que permite a quantificação dos níveis de mRNA de genes de interesse em diferentes condições (BUSTIN, 2002), tem acelerado consideravelmente a compreensão dos mecanismos envolvidos e o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da tolerância a estresses (KASUGA et al., 2004).

A técnica baseia-se na detecção e quantificação de compostos fluorescentes, que emitem um sinal de luz que aumenta na proporção direta a quantidade do produto de PCR em uma reação, permitindo monitorar a quantidade de produto gerado durante todos os ciclos (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

O ponto em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, denominado de *Cycle Threshold* ( $C_T$ ), permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência (DORAK, 2004). Dessa forma, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam à quantidade de produto amplificado em tempo real.

A quantificação da expressão dos genes é feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo a um outro grupo não exposto, denominado grupo controle (ZARLENGA & HIGGINS, 2001).

A utilização de um gene constitutivo como controle endógeno na reação de PCR quantitativo e como fator de normalização dos dados é controverso (BUSTIN, 2002). Um dos requisitos mais importantes para a escolha de um

gene candidato a controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Seguindo esse raciocínio, as flutuações decorrentes a variações de pipetagem e, conseqüentemente na concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou de PCR seriam corrigidas pela expressão do gene constitutivo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

Uma reação de PCR é basicamente separada em três fases (Figura 1): Fase exponencial: onde o dobro do produto é acumulado em cada ciclo (eficiência da reação de 100%), a reação é extremamente específica e precisa; Fase linear: onde ocorre o consumo dos componentes da reação, esta é uma fase lenta e de alta variabilidade; e Fase platô: os reagentes de PCR são produzidos em menor intensidade e começam a ser consumidos.

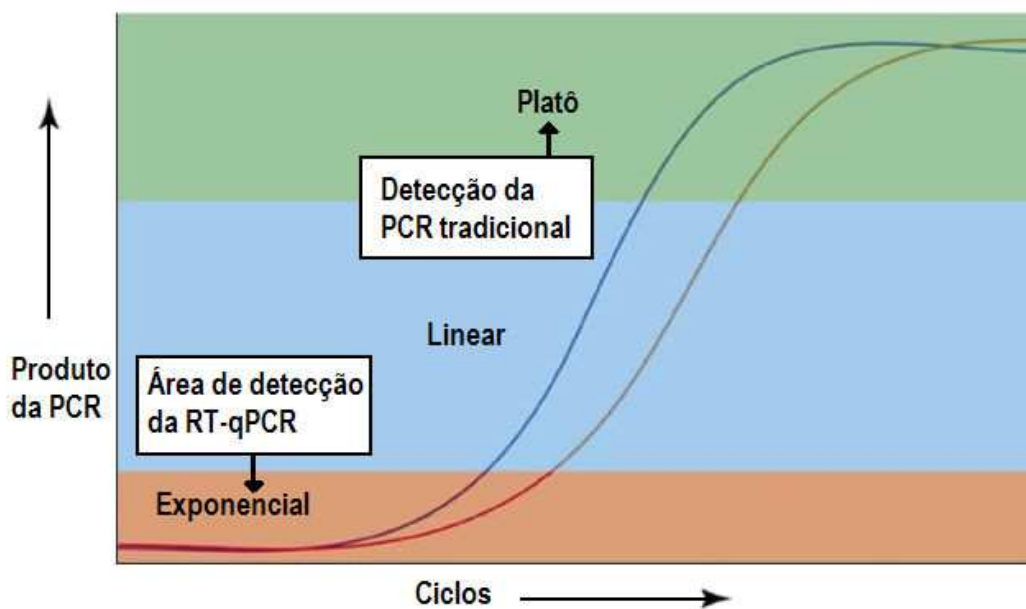


Figura 1. Fases da PCR. A detecção da PCR tradicional ocorre na fase platô, enquanto que na PCR em tempo real, a detecção ocorre na fase exponencial da reação.

- **Terminologias comumente utilizadas na PCR em tempo real.**

**Alvo (*template*):** Uma sequência de RNA ou DNA ou gene de interesse.

**Amplicon:** curto segmento de DNA ou cDNA gerado pelo processo da PCR.

**Amplification Plot:** gráfico do sinal fluorescente em comparação ao número do ciclo.

**Baseline:** ciclos iniciais da PCR, com poucas mudanças no sinal de fluorescência.

**Calibrador:** amostra utilizada como base para resultados de expressão comparativa.

**Controle endógeno:** sequência de um gene contida em uma amostra que é usada para normalizar as quantidades do alvo. Além da sequência alvo, um controle endógeno é quantificado como um meio de correção dos resultados que podem ser distorcidos pelas diferenças da quantidade inicial de ácido nucléico. Os controles endógenos são exemplos de uma referência ativa.

**$C_T$  (*cycle threshold*):** número do ciclo no qual a reação cruza o limiar de detecção (threshold). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Os valores de  $C_T$  são logarítmicos e são usados diretamente (método  $C_T$  comparativo) ou indiretamente (interpolação para curvas padrões para criar valores lineares) para as análises quantitativas.

**Eficiência de amplificação:** taxa na qual um *amplicon* da PCR é gerado, geralmente medida como um valor percentual. Se um *amplicon* dobrar em quantidade durante a fase geométrica de amplificação da PCR, então se diz que a PCR foi 100% eficiente.

**NTC (*no template control*):** Uma amostra que não contém o gene alvo. É utilizado para verificar a qualidade da amplificação.

**Padrão:** Uma amostra de concentração conhecida utilizada para construir uma curva padrão. Correndo padrões de concentrações variadas, cria-se uma curva padrão da qual pode-se extrapolar a quantidade de uma amostra desconhecida.

**Referência ativa:** Um sinal ativo usado para normalizar os resultados experimentais. Os controles endógenos são exemplos de uma referência ativa.

**Referência passiva:** Um corante que forneça uma referência de fluorescência interna para a qual o sinal do corante *reporter* pode ser normalizado durante a análise dos dados. A normalização é necessária para corrigir as flutuações causadas por alterações na concentração ou volume da reação.

**Rn (normalized reporter):** A intensidade de emissão de fluorescência do corante *reporter* dividida pela intensidade de emissão de fluorescência do corante da referência passiva.

**Rn+:** Valor do Rn de uma reação que contém todos os componentes, incluindo o gene alvo.

**Rn-:** Valor do Rn de uma amostra não reagente. O valor Rn pode ser obtido a partir dos ciclos iniciais de uma PCR em tempo real, ou uma reação que não contenha nenhum gene alvo.

**$\Delta Rn$ :** A magnitude do sinal gerado por um determinado conjunto de condições da PCR. O valor de  $\Delta Rn$  é determinado pela fórmula  $[(Rn+) - (Rn-)]$ .

**Threshold:** Desvio padrão médio do Rn para os ciclos iniciais da PCR multiplicado por um fator ajustável. O *threshold* deve ser ajustado na região associada com um crescimento exponencial do produto de PCR.

**Unknown:** Uma amostra contendo uma quantidade de gene alvo desconhecida. Esta é a amostra cuja quantidade você quer determinar.

Algumas das terminologias utilizadas com maior frequência na PCR em tempo real pode ser observada na Figura 2.

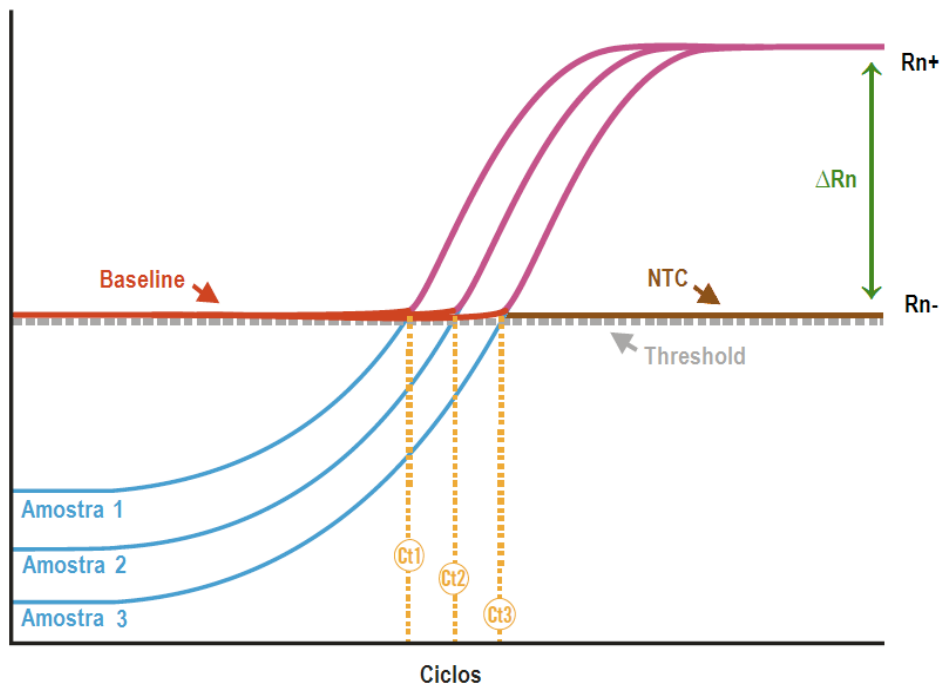


Figura 2. Terminologias comumente utilizadas na PCR em tempo real.

- **Fluoróforos**

Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Os fluoróforos mais utilizados são o *SYBR® Green* e *TaqMan®*.

### ***SYBR® Green***

O *SYBR® Green* apresenta o princípio de detecção de toda fita dupla de DNA, incluindo produtos de reações inespecíficas. É um agente intercalante que se liga entre a fita dupla de DNA presente na amostra, e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador emite uma fluorescência. As vantagens da utilização do *SYBR® Green* são: baixo custo; facilidade no uso; alta especificidade; e não exige utilização de sondas. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla, incluindo os dímeros de oligonucleotídeos e

outros produtos inespecíficos, podendo gerar ocorrências de reações falso-positivas. Em decorrência disso, os ensaios que utilizam o fluoróforo *SYBR® Green* devem ter desenho cauteloso dos oligonucleotídeos para evitar-se possíveis resultados indesejados (APPLIED BIOSYSTEM, 2010; NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

### ***TaqMan®***

*TaqMan®* é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' → 3'da *Taq* DNA polimerase separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, 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 sequência alvo é estabelecida. A principal desvantagem da utilização do fluoróforo *TaqMan®* é que esse tipo de sonda 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 oligonucleotídeo pode ser usado, detectando diferentes sequências alvo (APPLIED BIOSYSTEM, 2010; HEID et al.1996; NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

- **Quantificação absoluta e relativa**

Para calcular os resultados dos ensaios de quantificação, pode ser utilizada a quantificação absoluta ou relativa.

A quantificação absoluta é utilizada para quantificar amostras desconhecidas interpolando suas quantidades a partir de uma curva padrão, por exemplo, a quantificação absoluta deve ser utilizada para correlacionar o número de cópias virais com um estado de uma doença. É de interesse para o pesquisador saber o número exato de cópias do RNA alvo em uma determinada amostra biológica para monitorar o progresso da doença (APPLIED BIOSYSTEM, 2010).

A quantificação relativa é a análise comparativa do gene de interesse com o controle interno ou calibrador. Este calibrador pode, por exemplo, ser uma amostra que não recebeu o tratamento em estudo, ou uma amostra no tempo zero de tratamento (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A quantificação relativa permite uma acurada comparação nos níveis de expressão do gene de interesse de uma amostra relativa em relação à outra amostra de referência, por exemplo, uma amostra controle não tratada. Para validar a quantificação relativa é importante que todas as reações ocorram sob condições ótimas e similares. Os métodos utilizados para calcular a quantificação relativa são: método da curva padrão e método  $C_T$  comparativo.

### **Método da curva padrão**

Neste método, a quantidade é expressa relativa a uma amostra de referência, tal como o calibrador. Para todas as amostras experimentais, a quantidade do alvo é determinada a partir da curva padrão e dividida pela quantidade alvo do calibrador. Assim, o calibrador se torna a amostra "1x" e todas as outras quantidades são expressas como uma diferença de "n" vezes em relação ao calibrador.

É importante salientar que o DNA ou RNA estoque seja diluído com precisão, se utilizar uma diluição seriada de duas vezes para construir uma curva padrão, as unidades podem ser os valores de diluição 1; 0,5; 0,25; 0,125; e assim por diante. A vantagem deste método é que ele exige a menor quantidade de validação devido ao fato de que as eficiências da PCR do alvo e o controle endógeno não precisam ser equivalente. Por outro lado, este método exige que cada placa de reação contenha curvas padrões, assim, exige mais

reagentes e mais espaço em uma placa de reação. Esta abordagem oferece resultados quantitativos altamente precisos uma vez que os valores quantitativos das amostras desconhecidas são interpolados a partir de uma curva padrão (APPLIED BIOSYSTEM, 2010; APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

### **Método $C_T$ Comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ )**

O método  $C_T$  comparativo é semelhante ao método da curva padrão, exceto pelo fato que este utiliza a fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para atingir o mesmo resultado para a quantificação relativa.

A vantagem de utilizar o método  $C_T$  comparativo é que não é necessário correr uma curva padrão em cada placa, quando as eficiências de PCR entre o alvo e o controle endógeno forem relativamente equivalentes. Essa estratégia resulta em economia de reagente e elimina a possibilidade de qualquer erro de diluição das amostras para montagem da curva padrão. O método  $C_T$  comparativo é útil quando um grande número de alvos e/ou amostras são testados.

Para um cálculo  $\Delta\Delta C_T$  válido, a eficiência da amplificação do alvo e a eficiência da amplificação do controle endógeno devem ser aproximadamente iguais. Para cada tratamento é detectado o valor de  $C_T$  tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do  $C_T$  do gene alvo é subtraído do valor do  $C_T$  do controle endógeno, para normalizar a reação. Obtém, então, o valor de  $\Delta C_T$ . O valor de  $\Delta C_T$  dos tratamentos é subtraído do valor do  $\Delta C_T$  da amostra controle (calibrador), tendo-se o valor de  $\Delta\Delta C_T$ . Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno (APPLIED BIOSYSTEM, 2010; APPLIED BIOSYSTEMS, 2008).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Montagem do Experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação com os genótipos BR-16 (suscetível) e Embrapa 48 (tolerante) em um esquema fatorial de 3x2x3, sob três níveis de déficit hídrico, sendo: a) controle irrigado, 6 repetições, com potencial hídrico variando de -0,1 a -0,3 MPa, b) 6 repetições, com potencial hídrico de -1,5 MPa e c) 6 repetições com potencial hídrico de -3,0 MPa (Tabela 2). O potencial hídrico das folhas foi avaliado utilizando-se uma Câmara de Scholander.

Os trifólios de uma planta de cada genótipo foram coletados, embalados em papel alumínio, identificados com o genótipo, tratamento, tempo de coleta e número da planta. Os materiais foram imersos imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer a -80°C para posterior extração de RNA.

**Tabela 2. Identificação dos RNAs extraídos.**

Identificação das amostras	Repetição	Genótipo	Potencial hídrico
1	1	BR-16	controle irrigado
2		BR-16	-1,5 Mpa
3		BR-16	-3,0 MPa
4		Embrapa 48	controle irrigado
5		Embrapa 48	-1,5 MPa
6		Embrapa 48	-3,0 MPa
7	2	BR-16	controle irrigado
8		BR-16	-1,5 MPa
9		BR-16	-3,0 MPa
10		Embrapa 48	controle irrigado
11		Embrapa 48	-1,5 MPa
12		Embrapa 48	-3,0 MPa
13	3	BR-16	controle irrigado
14		BR-16	-1,5 MPa
15		BR-16	-3,0 MPa
16		Embrapa 48	controle irrigado
17		Embrapa 48	-1,5 MPa
18		Embrapa 48	-3,0 MPa

### 3.2. Seleção dos genes

A seleção dos genes foi baseada em revisão de literatura, visando identificar genes envolvidos na resposta a seca. As sequências de nucleotídeos referentes a família HD-Zip em *A. thaliana* foram obtidas no “*National Center for Biotechnology Information – NCBI*” (NCBI, 2008). As sequências de *A. thaliana* foram comparadas com o banco de dados Phytozome v3.1.1 (PHYTOZOME, 2009) para acessar o genoma da soja. A busca no genoma da soja foi realizada utilizando a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*).

### 3.3. Alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências da família HD-Zip em soja, foi realizado com o auxílio do programa Vector NTI® (*Invitrogen*). Adicionalmente, foi feito um alinhamento somente da subfamília HD-Zip I de soja a fim de se determinar a similaridade ente as sequências obtidas e determinar quais oligonucleotídeos usar nas análises de RT-qPCR.

### 3.4. Desenho dos oligonucleotídeos

O desenho dos oligonucleotídeos foi realizado com o auxílio do programa Primer Express® Software 3.0 (*Applied Biosystems*), onde foram estabelecidos alguns parâmetros de forma a favorecer a funcionalidade dos oligonucleotídeos desenhados (Tabela 3).

**Tabela 3. Parâmetros utilizados para o desenho dos oligonucleotídeos.**

	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do oligonucleotídeo	18 bases	25 bases
Tm do Amplicon	75°C	85°C
Tamanho do Amplicom	50 bases	150 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado novamente o programa Vector NTI® (*Invitrogen*) para verificar a formação de dímeros, dobramentos (*hairpin*) e força de ligação entre os oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que o  $\Delta G$  da formação de dímeros e dobramentos fosse maior que -9 cal/mole. Foram desenhados 8 pares de oligonucleotídeos referentes a subfamília HD-Zip I (Tabela 4), relacionada com estresse hídrico, e 2 pares de controles endógenos (Tabela 5).

**Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados.**

Oligonucleotídeos	Sequência	Tm	Tamanho esperado do fragmento (pb)
GmHB1-Fw	5' GAGTCTGGACGGATTTTCTTT 3'	51,4	139
GmHB1-Rv	5' AGGTGAAGAAAGGTGCCT 3'	52,5	
GmHB3-Fw	5' CTCTTTCCCACCTCATCACTTT 3'	53,7	95
GmHB3-Rv	5' TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTCTA 3'	52,3	
GmHB6-Fw	5' ACGATGGAACAAAGTAAGAGTGAC 3'	53,1	114
GmHB6-Rv	5' GCAGTCGTCGTTGTTGTTGA 3'	54,1	
GmHB7-Fw	5' GTGTTGAGGCAGAACTTACAC 3'	50,5	147
GmHB7-Rv	5' TTCTAGGCTCAAGCCTTGCTC 3'	54,3	
GmHB13-Fw	5' GCCAGAGATTCAGTGCCAAA 3'	54,9	122
GmHB13-Rv	5' AATTGAAATGTTGCTGCTCCA 3'	54,5	
GmHB21-Fw	5' TCCACGGCACCTTCAAAT 3'	53,3	107
GmHB21-Rv	5' GCATGGTTCTTCAGGCA 3'	49,2	
GmHB22-Fw	5' TGGGGATCAAGAAACAGTG 3'	50,1	85
GmHB22-Rv	5' ATTATTCTGCTGCTGCTGGT 3'	51,4	
GmHB40-Fw	5' TTGAAGAAGATGTGGATTACTC 3'	47,5	94
GmHB40-Rv	5' TAGTAAGCCCAGGTCCAAA 3'	49,5	

**Tabela 5. Sequência dos controles endógenos utilizados nas reações de RT-qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados.**

Controles endógenos	Sequência	Tm	Tamanho esperado do fragmento (pb)
rRNA18S-Fw	5' AAACGGCTACCACATCCAAG 3'	53,8	154
rRNA18S-Rv	5' CCTTCAATGGATCCATCGTTA 3'	53,7	
$\beta$ -actina-Fw	5' GAGCTATGAATTGCCTGATGG 3'	53,6	118
$\beta$ -actina -Rv	5' CGTTTCATGAATTCCAGTAGC 3'	51,3	

### 3.5. Extração de RNA

Para a extração de RNA total foi utilizada a metodologia descrita por Chomczynski & Sacchi (1987), utilizando-se o reagente Trizol (*Invitrogen*),

seguinto as recomendações do fabricante. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase AWAY® - *Invitrogen*).

Foram extraídas 3 repetições das amostras de RNA dos trifólios de uma planta de cada genótipo. A integridade do RNA total extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo tampão TBE (Tris/ácido bórico/EDTA) 1x e corado com brometo de etídio. Todos os materiais utilizados para eletroforese foram previamente tratados com inibidor de RNase (RNase AWAY®, *Invitrogen*). Foram adicionados no gel de agarose 2µL de RNA com 2µL de tampão de amostra 40% sacarose (4g de sacarose, 0,025g de azul de bromofenol, 10mL de água).

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas 260nm e 280nm, cuja relação 260/280 fornece uma estimativa da pureza do ácido nucléico (SAMBROOK et al. 2001) e como branco foi utilizada H<sub>2</sub>O DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1%. Obteve-se um valor de concentração médio de 1,4 µg/µL.

### 3.6. Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com Dnase I (*Invitrogen*) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se 2µg de RNA total, 1µL de dNTP 10mM (*Invitrogen*), 1µL de Oligo(dT)15 Primer (*Promega*) (0,5µg/µL) e 3µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Em seguida, a reação foi aquecida a 65°C por 5 minutos e adicionado 4µL de Tampão 5X, 1µL de DTT 0,1M (*Invitrogen*), 1µL de RNaseOUT (40U/µL) (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen*) e 0,3µL de Superscript™ III Reverse Transcriptase 40U/µL (*Invitrogen*). A reação foi aquecida a 50°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos, em seguida, adicionado 1µL de RNase H (*Ribonuclease H, Invitrogen*) 2U/µL e incubado por 37°C por 20 minutos, resultando em um volume final de 20µL. O produto da reação foi em seguida armazenado a 4°C e usado posteriormente para as reações de PCR quantitativo em tempo real.

### 3.7. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A análise de RT-qPCR foi realizada no aparelho StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*) no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas da UFV, e todas as análises de expressão gênica foram realizadas com a utilização do programa StepOne™ Software v.2.0 (*Applied Biosystems*). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX Reference Dye (*Invitrogen*) para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. Em todas as reações foram utilizadas o fluoróforo SYBR® Green (*Applied Biosystems*).

#### 3.7.1. Curva de eficiência

Com o intuito de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada oligonucleotídeo, foram realizadas diluições seriadas de cDNA (concentrado, 5x diluído, 25x diluído e 125x diluído) para todos os pares de oligonucleotídeos e controles endógenos, a fim de determinar a eficiência de cada sistema de quantificação. Esse procedimento garante que não ocorra diferenças entre os alvos e o normalizador. Após verificar a eficiência dos genes, escolheu-se a diluição do cDNA e a concentração dos oligonucleotídeos adequadas para preparar as reações da quantificação relativa.

As amplificações foram realizadas em triplicatas utilizando 1µL de cDNA; 2µL de tampão (10X); 1,2µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,05µL de dNTPs (10mM); 0,4µL de ROX Reference Dye (50X); 2µL de SYBR® Green; 0,05µL de Taq platinum (5U/µL) e 12,7µL de água, para um volume final da reação de 20µL.

As condições da ciclagem de eficiência da reação foram 95°C durante 5 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. E as condições da ciclagem da curva de dissociação foram 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos.

### **3.7.2. Quantificação relativa**

Foi utilizado o método  $\Delta\Delta C_T$  para as análises de quantificação relativa. O mix e as condições da ciclagem da quantificação relativa foram as mesmas utilizadas nas análises de eficiência.

Após a quantificação relativa foi realizada uma etapa de curva de dissociação para verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos, amplificações inespecíficas, possíveis erros e contaminações. A presença de um único pico de dissociação das fitas dos produtos do PCR foi considerada como evidencia da especificidade da reação.

### **3.8. Identificação dos elementos cis-regulatórios**

A identificação dos elementos cis-regulatórios foi feita através do banco de dados PLACE (*Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*) (HIGO et al., 1999). Os elementos cis-regulatórios foram selecionados por apresentarem heterólogos com importantes funções na resposta à seca. Para isso, foram analisados 2.000 nucleotídeos acima da região 5' não traduzida, para cada gene encontrado.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Seleção dos genes

Por meio da busca no banco de dados NCBI, foram obtidas 17 sequências referentes à subfamília HD-Zip I, 8 sequências referentes à subfamília HD-Zip II, 5 sequências referentes à subfamília HD-Zip III e 10 sequências referentes à subfamília HD-Zip IV em *A. thaliana* (Tabela 6).

**Tabela 6. Sequência da Família HD-Zip em *A. thaliana*, tamanho e o código de acesso no NCBI.**

Subfamília	Identificação da sequência	Tamanho da sequência (pb)	Código de acesso no NCBI
HD-ZipI	ATHB1	1440	NM_111013
	ATHB3	1480	NM_121519
	ATHB5	1460	NM_001037074
	ATHB6	1529	NM_127808
	ATHB7	1327	NM_130233
	ATHB12	986	NM_116054
	ATHB13	1401	AF208044
	ATHB16	1518	NM_120171
	ATHB20	1222	NM_110988
	ATHB21	1205	NM_126310
	ATHB22	558	NM_179935
	ATHB23	1415	NM_123338
	ATHB40	801	NM_119838
	ATHB51	710	NM_120460
	ATHB52	705	NM_124777
HD-ZipII	ATHB53	896	NM_126068
	ATHB54	1674	NM_102467
	ATHB2	1171	NM_117780
	ATHB4	801	NM_119838
	HAT1	1211	NM_117849
	HAT2	1284	NM_124108
	HAT3	1357	NM_115903
	HAT9	1170	NM_127845
HD-ZipIII	HAT14	1433	NM_203014
	HAT22	1370	NM_119941
	ATHB8	3023	NM_119441
	ATHB9	2936	NM_102785
	ATHB14	3064	NM_129025
HD-ZipIV	ATHB15	3509	NM_001084233
	IFL1	3502	NM_125462
	ANL2	3287	NM_001125435
	ATML1	2957	NM_118295
	HDG1	2836	NM_115979
	HDG3	2863	EF988635
	HDG7	2049	NM_124596
	HDG9	2157	NM_121738
	HDG10	2199	NM_103188
	HDG11	3067	NM_105996
HDG12	2755	NM_101655	
PDF2	3085	NM_116727	

Após obtidas as sequências de *A. thaliana* no NCBI, foi realizado um BLASTn no Phytozome resultando na identificação de dezesseis sequências de genes referentes a subfamília HD-Zip I, 3 sequências de genes referentes a subfamília HD-Zip II, 4 sequências de genes referentes a Subfamília HD-Zip III e 4 sequências de genes referentes a Subfamília HD-Zip IV (Tabela 7).

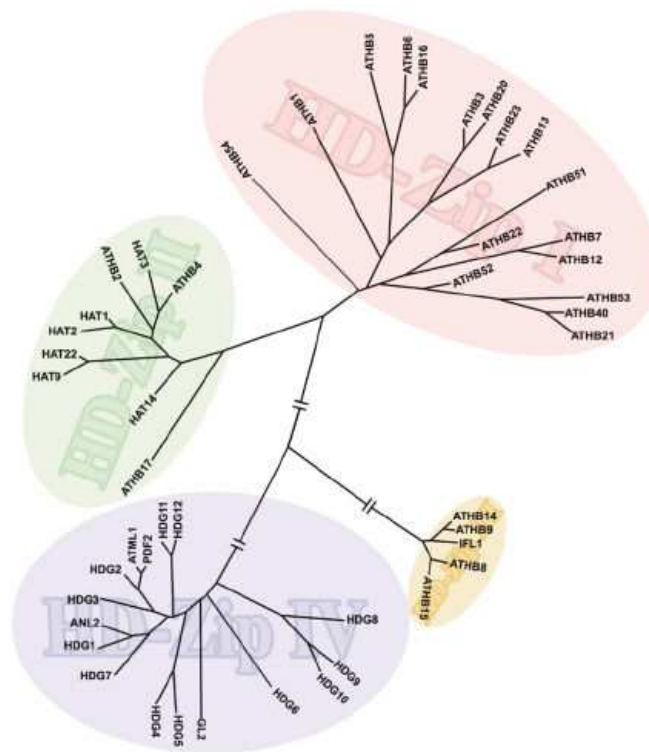
**Tabela 7. Sequência dos genes referente à Família HD-Zip em soja, tamanho e o código de acesso no Phytozome.**

Subfamília	Identificação da sequência	Tamanho da sequência (pb)	Código de acesso no Phytozome
HD-ZipI	GmHB1	855	Glyma19g01300.1
	GmHB3	879	Glyma19g02490.1
	GmHB5	939	Glyma08g14130.1
	GmHB6	969	Glyma18g01830.1
	GmHB7	738	Glyma16g02390.1
	GmHB12	543	Glyma19g44800.1
	GmHB13	843	Glyma08g40970.1
	GmHB16	666	Glyma13g21330.1
	GmHB20	852	Glyma01g05230.1
	GmHB21	852	Glyma07g40190.1
	GmHB22	693	Glyma10g07440.1
	GmHB23	927	Glyma09g37300.1
	GmHB40	996	Glyma05g01390.1
	GmHB51	600	Glyma19g37380.1
GmHB53	1680	Glyma03g23910.1	
GmHB54	1038	Glyma02g02630.1	
HD-ZipII	GmHB2	984	Glyma09g16790.1
	HAT3	615	Glyma03g26700.1
	HAT14	616	Glyma08g15780.1
HD-ZipIII	GmHB8	1968	Glyma04g09000.1
	GmHB9	2529	Glyma15g13640.1
	GmHB14	2526	Glyma12g08080.1
	GmHB15	2517	Glyma07g01940.1
HD-ZipIV	ATML1	2199	Glyma11g00570.1
	HDG1	2412	Glyma07g08340.1
	HDG3	472	Glyma0196s00200.1
	HDG11	2157	Glyma16g34350.1

#### 4.2. Alinhamento das sequências

A partir do alinhamento das sequências da família HD-Zip em soja realizado pelo programa Vector NTI® (*Invitrogen*), pôde-se observar que as quatro subfamílias de HD-Zip de soja foram separadas como os resultados obtidos por Ariel et al. (2007) analisando a mesma família em *A. thaliana* (Figura 3).

A)



TRENDS in Plant Science

B)

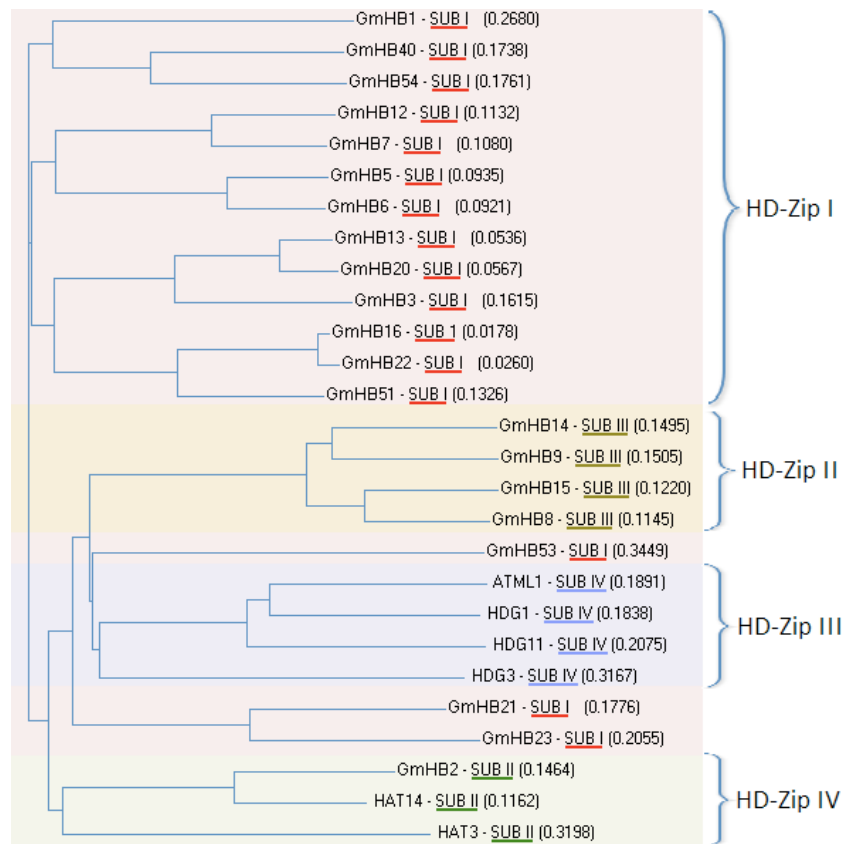
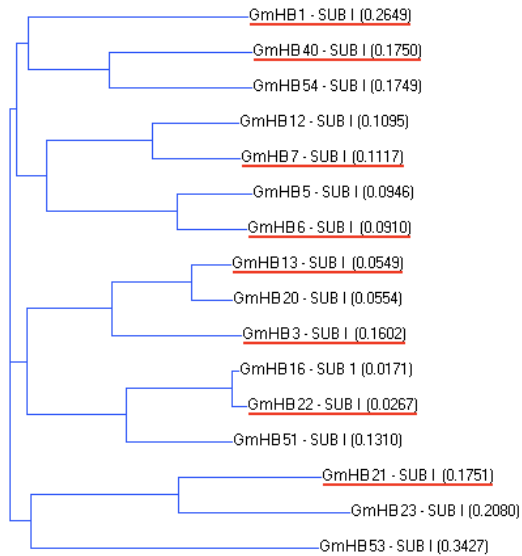


Figura 3. A) Árvore filogenética das seqüências em *A. thaliana* (ARIEL et al., 2007), B) Alinhamento das seqüências de soja utilizando o programa Vector NTI® (Invitrogen).

Em seguida, novamente com a utilização do programa Vector NTI® (*Invitrogen*), foi feito outro alinhamento somente da subfamília HD-Zip I de soja. Dentre as dezesseis sequências obtidas, com base na similaridade, foram escolhidas oito sequências para o desenho dos oligonucleotídeos, GmHB1, GmHB3, GmHB6, GmHB7, GmHB13, GmHB21, GmHB22 e GmHB40 (Figura 4).



**Figura 4.** Alinhamento das sequências da subfamília HD-Zip I de soja. As sequências sublinhadas em vermelho foram escolhidas para desenho dos oligonucleotídeos.

### 4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

#### 4.3.1. Curva de eficiência

Uma curva de eficiência foi gerada à partir de concentrações conhecidas de amostras de cDNA utilizando as diluições: concentrado, 5x, 25x, 125x para cada gene estudado.

A curva de eficiência foi feita utilizando todos os genes alvo e os controles endógenos rRNA18S e  $\beta$ -actina, visando a identificação da melhor concentração a ser utilizada na quantificação relativa. Para a análise dos níveis de expressão dos genes, foi escolhido como concentração de trabalho, o cDNA 5x diluído e a concentração dos oligonucleotídeos de 2,5 $\mu$ M (0,3 $\mu$ L na reação).

A eficiência da amplificação é medida pela fórmula:  $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$  (STRATAGENE, 2004), onde o *slope* indica a inclinação da reta, cujo valor próximo a -3,3 indica uma eficiência próxima de 100%.

Com base nos resultados da eficiência para os 8 genes, considerando o valor próximo de 100% dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), apenas os genes GmHB6, GmHB13 e GmHB21 obtiveram resultados satisfatórios, obtendo, respectivamente, 77%, 86% e 98% de eficiência.

A eficiência dos controles endógenos foi de 92% para o gene rRNA18S e 88% para o gene  $\beta$ -actina. Posteriormente, ambos foram submetidos a análise no programa GeNorm (GENORM, 2009) onde verificou-se que o menor valor de M obtido foi para o gene  $\beta$ -actina (0,0461) enquanto que o rRNA18S apresentou um valor de 0,0655.

Vandesompele et al. (2002) definiram como parâmetro para quantificar a estabilidade de genes candidatos a controle endógenos um valor da média da estabilidade de expressão (M), onde um baixo valor de M é indicativo de uma expressão mais estável. Com base nos resultados obtidos, foi escolhido o gene  $\beta$ -actina para ser utilizado como controle endógeno nas análises de quantificação relativa.

#### **4.3.2. Quantificação relativa**

Para todas as análises de expressão utilizou-se como normalizador o controle endógeno  $\beta$ -actina e como calibrador para ambos os genótipos utilizou-se o tratamento controle irrigado.

A análise do nível de expressão revelou uma expressão diferencial dos genes GmHB6, GmHB13, GmHB21 em ambos genótipos, suscetível (BR-16) e tolerante (Embrapa 48).

A expressão do gene GmHB6 (Figura 5) é reduzida em ambos os genótipos sob estresse hídrico, mas a redução é de apenas 20% no genótipo tolerante (Embrapa 48) sob estresse hídrico severo (-3,0 MPa), e de aproximadamente 90% no genótipo suscetível (BR-16). Soderman et al. (1999) sugeriram que este gene esteja envolvido com a divisão celular e

diferenciação, resultados estes obtidos da transformação de *A. thaliana* utilizando o promotor do gene ATHB6 fusionado no gene gus.

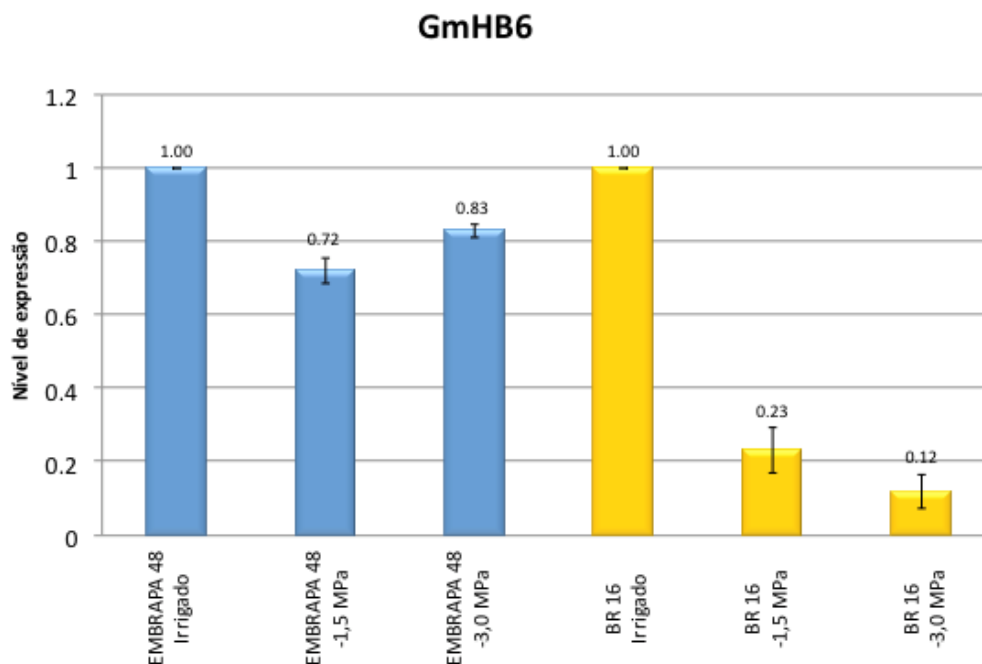


Figura 5. Nível de expressão do gene GmHB6. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16).

No desenvolvimento foliar a expressão do gene ATHB6 na epiderme é detectado em um gradiente. Ocorre uma redução na expressão a partir da ponta da folha para a base. Este padrão se correlaciona com o padrão de divisão e diferenciação celular na epiderme foliar (LEE et al., 2001). A redução da expressão deste fator transcricional possivelmente cessa o desenvolvimento da parte aérea, como forma de reduzir a superfície evaporatória. Ao mesmo tempo, particiona mais fotoassimilatos para a raiz, de forma que a mesma possa atingir maior profundidade e/ou volume de solo explorado. Assim, mais rapidamente, pode repor a água perdida por transpiração. Esta redução no crescimento das folhas está intimamente relacionada com a redução na atividade de divisão celular. (TARDIEU, et al., 2000).

Análises fenotípicas de plantas de *A. thaliana* com elevado nível de ATHB6 sugerem que este gene regule o crescimento da planta em resposta ao ABA ou em resposta ao déficit hídrico. (HJESLLSTRÖM et al., 2003). Estes resultados sugerem um paralelismo entre as funções de ATHB6 e GmHB6, e

indicam que o gene da soja possa, também, ser negativamente regulado por ABA.

O gene GmHB13 (Figura 6) teve um aumento de aproximadamente 4,8 vezes na expressão no genótipo tolerante quando submetido ao estresse. Já no genótipo suscetível, houve uma redução de 65% na expressão do gene sob potencial hídrico severo. Hanson et al. (2001) e Henriksson et al. (2005) relataram que a superexpressão do gene heterólogo ATHB13 fusionado ao promotor constitutivo 35S em plantas de *A. thaliana* tornaram as plantas mais tolerantes ao estresse hídrico. Também trata-se de um gene induzido por estresse hídrico e ABA.

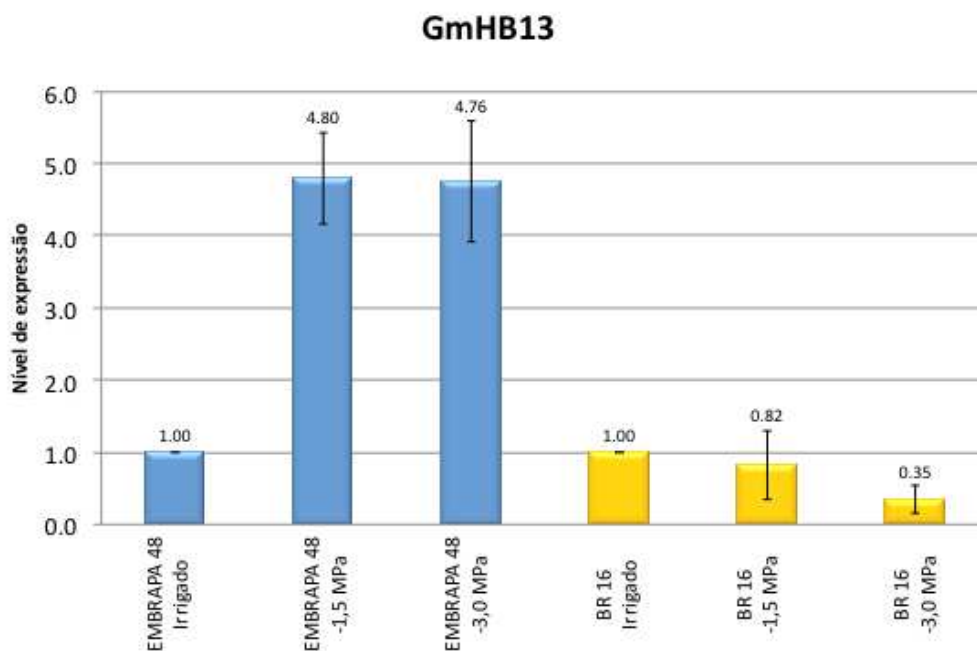


Figura 6. Nível de expressão do gene GmHB13. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16).

Segundo Hanson et al. (2001), o gene ATHB13 está relacionado com alterações nos níveis de açúcar nas folhas e em cotilédones em desenvolvimento. Esses autores mostraram que plantas transformadas com esse gene fusionado com um promotor constitutivo, tiveram o fenótipo alterado somente quando sacarose exógena era aplicada.

O gene ATHB13 é expresso na parte aérea da planta. O padrão de expressão do gene é compartilhado em *A. thaliana* e tomate (*Solanum*

*lycopersicum*). O gene homeobox de tomate VAHOX1 é expresso em células do floema, mas ao contrário do gene ATHB13, a expressão do VAHOX1 está localizada em caules maduros e não é expresso em folhas (TORNERO et al. 1996).

Para o gene GmHB21 (Figura 7) pode se observar um aumento na expressão em ambos os genótipos quando submetidos ao estresse, sendo o aumento de expressão de aproximadamente 4 e 3 vezes no genótipo tolerante quando submetidos a estresse de -1,5 MPa e -3 MPa, e um aumento de expressão de aproximadamente 6 e 3 vezes no genótipo suscetível.

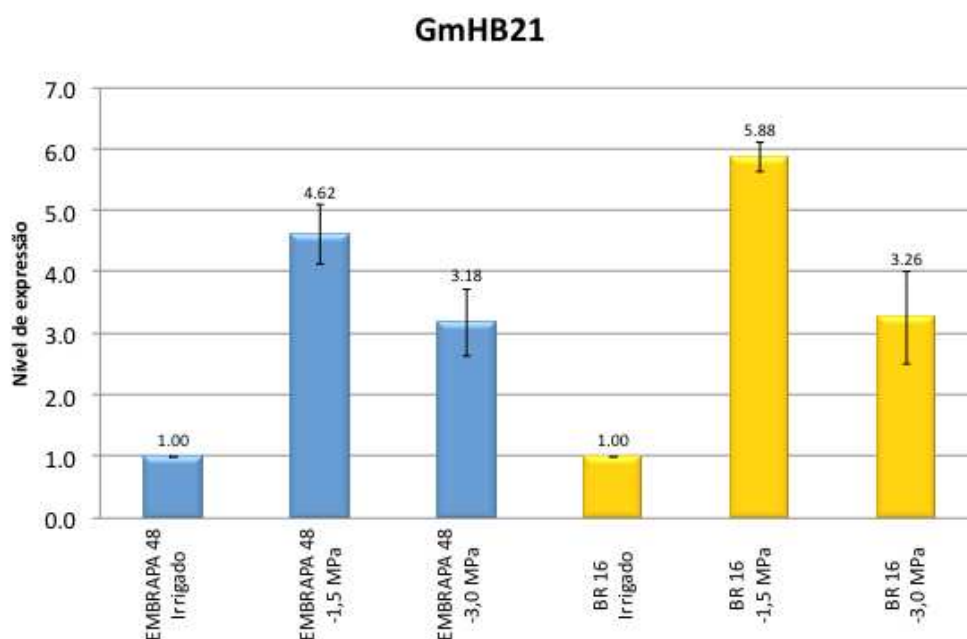


Figura 7. Nível de expressão do gene GmHB21. As barras em azul representam o genótipo tolerante (Embrapa 48) e as barras em amarelo representam o genótipo suscetível (BR 16).

Estes dados são similares aos encontrados por Henriksson et al. (2005) onde relataram um aumento de duas vezes na expressão do gene heterólogo ATHB21 quando submetidos ao déficit hídrico. Segundo os autores, o gene ATHB21 está presente em todos os tecidos da planta, o que explicaria a alta expressão em ambos os genótipos.

Vale ressaltar ainda que muitos genes relacionados à aclimação da planta podem ter sua expressão induzida. Entretanto, esta ativação pode

ocorrer em diferentes períodos. O genótipo tolerante demora mais tempo, sob restrição hídrica, a atingir o potencial foliar de -3 MPa. Uma análise temporal da expressão gênica mais detalhada, sob este estresse, poderia melhor esclarecer a cinética da expressão destes genes.

#### 4.4. Identificação dos elementos cis-regulatórios

Os genes GmHB6, GmHB13 e GmHB21 foram utilizados para a identificação dos elementos cis-regulatórios no banco de dados PLACE. A análise das regiões promotoras destes genes mostrou a presença de elementos cis-regulatórios relacionados ao estresse hídrico (Figura 8). Foram encontrados 9% de elementos cis-regulatórios relacionados ao estresse hídrico para o gene GmHB6, 10% para o gene GmHB13 e 14% para o gene GmHB21. O restante dos elementos cis-regulatórios encontrados estão relacionados a diversos outros fatores, tal como iluminação, germinação, salinidade, nodulação, dentre outros (Figura 9).

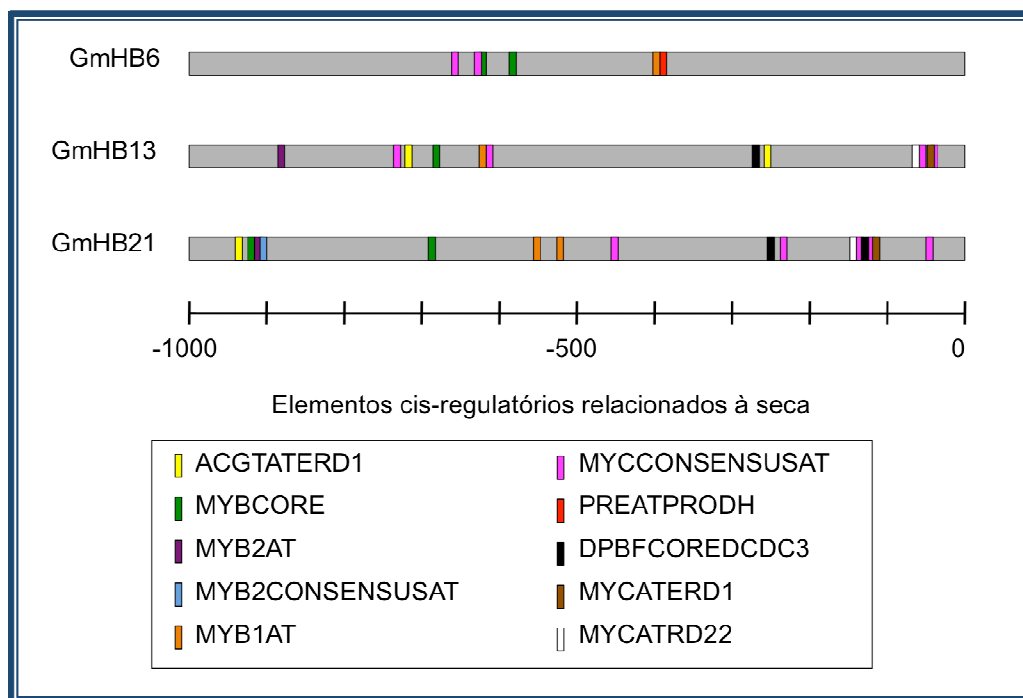
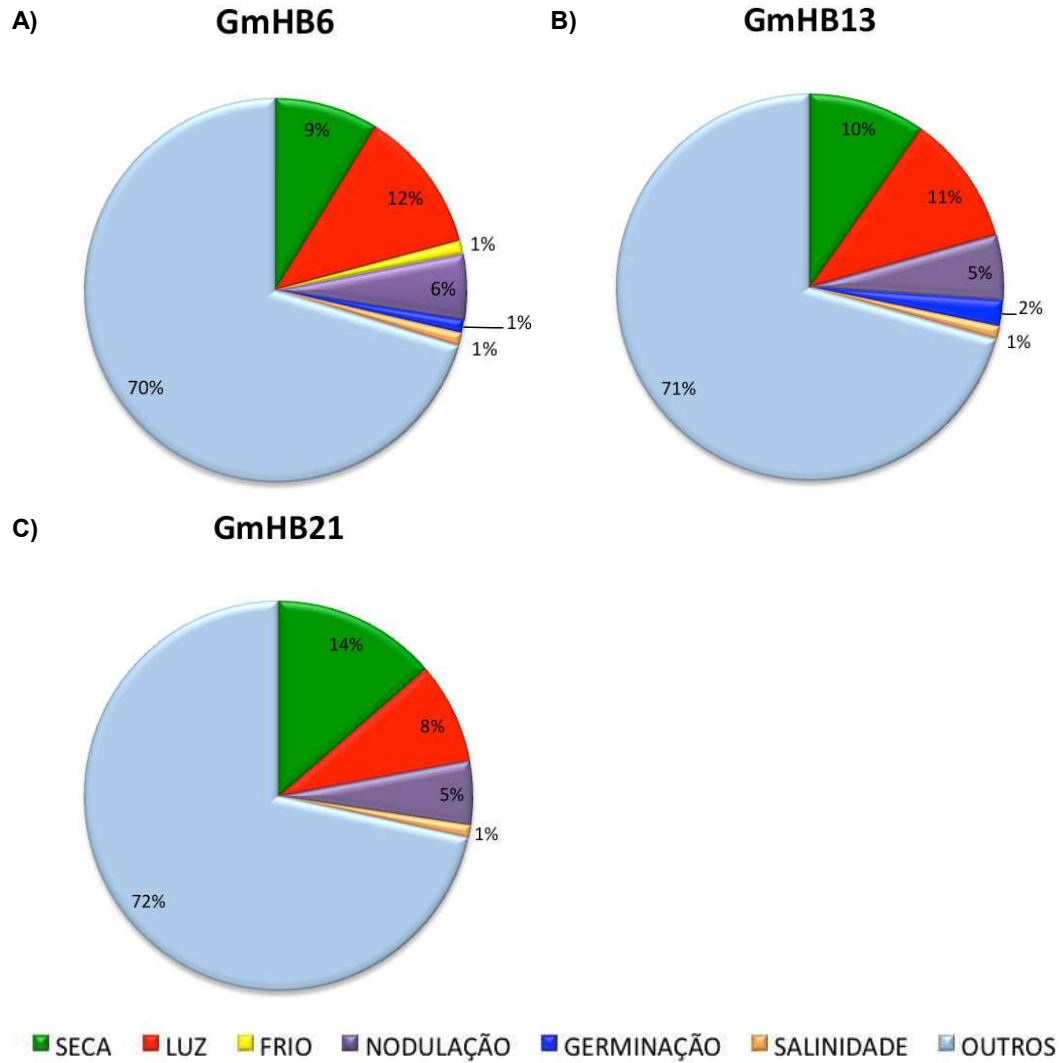


Figura 8. Localização dos elementos cis-regulatórios relacionados à seca na região promotora dos genes GmHB6, GmHB13 e GmHB21. Os elementos cis-regulatórios identificados foram mapeados para permitir comparações entre as regiões promotoras dos genes.



**Figura 9. Identificação dos elementos cis-regulatórios dos genes A) GmHB6, B) GmHB13 e C) GmHB21. Os elementos cis-regulatórios relacionados à seca estão representados nos gráficos pela cor verde.**

## 5. Conclusões

O uso da metodologia de PCR em tempo real permitiu constatar a expressão diferencial dos genes da subfamília HD-Zip I em soja envolvidos no mecanismo de tolerância da soja sob situações de déficit hídrico.

Dentre os três genes estudados, o GmHB13 foi claramente induzido pelo déficit hídrico e apresentou expressão diferencial em ambos os genótipos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e sabendo que a superexpressão de seu heterólogo em plantas de *A. thaliana* transgênica aumenta a tolerância à seca, podemos inferir que o gene GmHB13 esteja supostamente relacionado ao mecanismo de resposta à seca em soja. A indução do gene GmHB21 em ambos os genótipos, sugere que este gene possa estar controlando a expressão de genes de aclimatação à seca não ligados diretamente ao mecanismo de tolerância. O gene GmHB6 teve sua expressão reduzida em ambos os genótipos. A maior redução da expressão deste gene no genótipo suscetível, pode estar relacionada ao maior tempo de desidratação, visto que o mesmo atinge mais rapidamente o estresse hídrico severo.

A análise das regiões promotoras mostrou a presença de elementos cis-regulatórios relacionados ao estresse hídrico nos três genes estudados. Em conjunto com os resultados obtidos pela análise de PCR em tempo real, estes dados sugerem a participação dos genes da subfamília HD-Zip I, em especial o gene GmHB13, como mediadores da resposta ao déficit hídrico em soja.

O presente trabalho produziu informações relevantes para a compreensão da resposta ao déficit hídrico. Entretanto, ele não representa a conclusão de um projeto de pesquisa, mas o início de vários outros projetos, os quais certamente enriquecerão o conhecimento atual das bases moleculares dos mecanismos de tolerância à seca.

A partir da análise do perfil de expressão dos genes aqui apresentados, estudos mais aprofundados deverão ser realizados, com o objetivo de identificar genes específicos no processo de déficit hídrico, e assim possibilitar o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca.

## 6. Referências

- APPLIED BIOSYSTEM. 2010. Essentials of Real Time PCR. Disponível em: <[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_042485.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042485.pdf)>. Acesso em: 22 de março de 2010.
- APPLIED BIOSYSTEM. 2008. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 70p.
- ATKIN, O. K. & MACHEREL, D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*. 103:581-597.
- ARIEL, F. D.; MANAVELLA, P. A.; DEZAR, C. A.; CHAN, R. L. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*. 12: 9.
- BARNABÁS, B.; JAGER, K.; FEHÉR, A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*. 31:11- 38.
- BARTELS, D. & SUNKAR, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24:23-58.
- BECK, E. H.; FETTIG, S.; KNAKE, C.; HARTING, K.; BHATTARAI, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*. 32: 501-510.
- BUSTIN, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29: 23-39.
- CHAN, R. L.; GAGO, G. M.; PALENA, C. M.; GONZALEZ, D. H. 1998. Homeoboxes in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1442: 1–19.
- CHINNUSAMY, V; XIONG, L.; ZHU, J. K. Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvements. In: ASRAF, M.; HARRIS, P. J. C. (Ed). *Abiotic Stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. New York: Food Products Press. p.47-95. 2005.

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159
- CONAB (Companhia Nacional de Agricultura e Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/SojaSerieHist.xls>>. Acesso em: 20 de maio 2010.
- DEZAR, C. A.; GAGO, G. M.; GONZALES, D. H.; CHAN, R. L. 2005a. HAHB-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res.* 14, 429–440
- DEZAR, C. A.; FEDRIGO, G. V. CHAN, R. L. 2005b. The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene HAHB4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Sci.* 169, 447–459.
- DORAK, M. T. 2004. Real Time PCR Special Issue. *Methods Journal.* 25:4.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2010. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php?pagina=23](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23)>. Acesso em: 17 de agosto de 2010.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2008. Sistemas de Produção 13: Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste. 262p.
- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. 2007. Ecofisiologia da Soja. Londrina:Embrapa Soja. Circular Técnica 48. 9p.
- GAGO, G. M.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J.; GONZALEZ, D. H.; CHAN, R. L. 2002. HAHB-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell Environ.* 25:633–640.
- GENORM. normalization of real-time PCR expression data. Disponível em: <<http://medgen.ugent.be/~jydesomp/genorm>>. Acesso em: 30 de julho de 2009.

- HANSON, J.; JOHANNESSON, H.; ENGSTROM, P. 2001. Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZhdip gene ATHB13. *Plant Mol Biol.* 45:247–262.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-94.
- HENRIKSSON, E.; OLSSON, A. S. B.; JOHANNESSON, H.; HANSON, J.; ENGSTROM, P.; SODERMAN, E. 2005. Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* 139:509-518.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research.* 27:297-300.
- HJESLLSTRÖM, M.; OLSSON, A. S. B.; ENGSTRÖM, P.; SÖDERMAN, E. 2003. Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic *Arabidopsis* causes a suppression of stem elongation growth. *Plant Cell Environ.* 26: 1127–1136.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. & MENDES, I. C. 2001. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, (Embrapa Soja. Circular Técnica 35/ Embrapa Cerrados. Circular Técnica 13). 48p.
- ISODA, A.; WANG, P. 2002. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. *Plant Production Science.* 5:224-228.
- JOHANNESSON, H.; WANG, Y.; ENGSTRÖM, P. 2001. DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Mol. Biol.* 45:63–73.
- KASUGA, M.; MIURA, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2004. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiology.* 45: 346-350.
- KIM, J.; JUNG, J. H.; REYES, J. L.; KIM, Y. S.; KIM, S. Y.; CHUNG, K. S.; KIM, J. A.; LEE, M.; LEE, Y.; NARRY, KIM, V.; CHUA, N. H.; PARK, C. M. 2005.

- Micro RNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* 42: 84–94.
- LEE, Y. H.; OH, H. S.; CHEON, C. I. HWANG, I. T.; KIM, Y. J. CHUN, J. Y. 2001. Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene ATHB-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:133–141.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. 2001. *Methods.* 25: 402-408.
- MALLORY, A. C.; REINHART, B. J.; RHOADES M. W.; TANG, G.; ZAMORE, P. D.; BARTON, M. K.; BARTEL, D. P. 2004. Micro RNA control PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* 23:3356–3364.
- MEIJER, A. H.; DE KAM, R. J.; D'ERFURTH, I.; SHEN, W.; HOGE, J.H. 2000. HD-Zip proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties. *Mol. Gen. Genet.* 263:12–21.
- NCBI, *National Center for Biotechnology Information*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 30 de dezembro de 2008.
- NI, Y.; WANG, X.; LI, D.; XU, W.; LI, X. 2008. Novel cotton homeobox gene and its expression profiling in root development and in response to stresses and phytohormones. *Acta Biochim Biophys Sin.* 40:78–84.
- NOVAIS, C. M. & PIRES-ALVES, M. 2004. PCR em Tempo Real. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 33:10-13.
- OLSSON, A. S.; ENGSTRÖM, P.; SÖDERMAN, E. 2004. The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55:663-677.
- PALENA, C. M.; TRON, A. E.; BERTONCINI, C. W.; GONZÁLEZ, D. H.; CHAN, R. L. 2001. Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins. *J. Mol. Biol.* 308: 39-47.
- PHYTOZOME. Disponível em: <<http://www.phytozome.net>>. Acesso em: 21 de janeiro de 2009.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHENA, M. & DAVIS, R. W. 1992. HD-Zip protein members of *Arabidopsis* homeodomain protein superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:3894-3898.
- SESSA, G.; STEINDLER, C.; MORELLI, G.; RUBERTI, I. 1998. The *Arabidopsis* ATHB-8, -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related HD-Zip proteins. Plant Mol. Biol. 38:609-622.
- SHAO, H.; JIANG, S.; LI, F.; CHU, L.; ZHAO, C.; SHAO, M.; ZHAO, X.; LI, F. 2007. Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. Biointerfaces. 54:33-36.
- SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology. 3: 217-223.
- SHOEMAKER, R. C.; POLZIN, K.; LABATE, J.; SPECHT, J.; BRUMMER, E. C.; OLSON, T.; YOUNG, N. D.; CONCIBIDO, V. C.; WILCOX, J.; TAMULONIS, J. P.; KOCHERT, G.; BOERMA, H. R. 1996. Genome Duplication in Soybean (*Glycine Subgenus Soja*). Genetics 144:329-338.
- SÖDERMAN, E.; HJELLSTRÖM, M.; FAHLESON, J.; ENGSTRÖM, P. 1999. The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. Plant Mol Biol. 40: 1073-1083.
- SOY INFO CENTER. The Soybean Plant: Botany, Nomenclature, Taxonomy, Domestication, and Dissemination. Disponível em: <[http://www.soyinfocenter.com/HSS/soybean\\_plant2.php](http://www.soyinfocenter.com/HSS/soybean_plant2.php)>. Acesso em 09 de março de 2010.
- STILLER, I.; DULAI, S.; KONDRÁK, M.; TARNAI, R.; SZABÓ, L.; TOLDI, O.; BÁNFALVI, Z. 2008. Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Planta. 227:299-308.
- STRATAGENE. Introduction to Quantitative PCR - Methods and Application Guide. La Jolla, CA, 48p, 2004.

- TALAMÈ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. 2007. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*. 58: 229–240.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4ed. Artmed. 2008. 820p.
- TARDIEU, F.; REYMOND, M.; HAMARD, P.; GRANIER, C.; MULLER, B. 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany*. 51:1505-1514.
- TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. 1996. Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *Plant J*. 9:639–648.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3:7.
- WILLIAMS, L.; GRIGG, S. P.; XIE, M.; CHRISTENSEN, S.; FLETCHER, J. C. 2005. Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166 and its AtHD-Zip target genes. *Development*. 132:3657–3668.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KASUGA, M.; LIU, Q.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; SHIWARI, Z. K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. 2002. Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*. 23:1-8.
- ZARLENGA, D. S. & HIGGINS, J. 2001. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*. 101:215-230.