

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GUSTAVO HENRIQUE RECCHIA

**Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro
envolvidos na resistência ao estresse hídrico**

Piracicaba
2011

GUSTAVO HENRIQUE RECCHIA

**Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro
envolvidos na resistência ao estresse hídrico**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Recchia, Gustavo Henrique

Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvidos na resistência ao estresse hídrico / Gustavo Henrique Recchia; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2011.

152 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bioinformática 2. DNA complementar 3. Expressão gênica 4. Fatores de transcrição 5. Metabolismo celular 6. Proteínas da membrana 7. Proteínas de ligação do cálcio 8. Proteínas de transporte 9. Resistência genética vegetal
I. Título

CDU 633.35:575.111/112

Com todo amor e carinho dedico este trabalho aos meus pais, Geni e Antonio, que jamais mediram esforços para me oferecer a melhor educação possível, não somente para minha formação profissional, mas também para minha integridade moral e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai não somente pela orientação e profissionalismo que permitiram a realização deste trabalho, mas principalmente pela oportunidade a mim oferecida e pela confiança em mim depositada. A experiência em participar deste projeto ao seu lado, e de toda sua equipe, contribuiu de forma imensurável para minha formação acadêmica e profissional.

À Dra. Danielle Gregório Gomes Caldas, também por sua orientação, pelos valerosos conselhos e por sempre estar disposta a sanar os problemas encontrados no caminho.

Ao CENA/USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da unidade, pelas oportunidades concedidas durante o decorrer deste curso de Mestrado.

À FAPESP pela concessão da bolsa por todo o decorrer deste projeto.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (CEBIMEG – UNICAMP) e ao Prof. Dr. Márcio José da Silva, que nos auxiliaram no sequenciamento e nas análises de bioinformática.

Aos meus eternos amigos e companheiros Cleber, Viviane, Sheila e Micheline, que sempre estiveram presentes ao meu lado nestes últimos dois anos, não somente nos momentos de alegria, mas também sempre me oferecendo as palavras certas de incentivo e coragem nos momentos de dúvida e preocupação.

Pelos mesmos motivos também agradeço Enéas, Ana Beraldo e Aline, mas em especial por sempre estarem dispostos a me ajudar a solucionar as dúvidas encontradas nesta jornada e também nas atividades do laboratório. Seus conhecimentos comigo compartilhados foram vitais para a conclusão deste trabalho.

À nossa querida e sempre alegre Ludimila, por jamais ter medido esforços para nos ajudar a resolver nossos problemas. Jamais irei me esquecer que foi você quem primeiro me incentivou a vir fazer Mestrado no laboratório quando eu ainda estava na graduação.

Aos técnicos de nosso laboratório: Chico, Elias, Fábio e Wagner. A ajuda, e também os ensinamentos, por vocês oferecidos foram vitais a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Milena, Mariana Germano, Fabiana, Maria Júlia, Beatriz, Acácio, Mariana Redondo, Lina, Felipe, Fernanda, Jane, Lucas, Raquel, Rafael, Monita, Bianca e Marcela não somente por terem me acolhido tão bem, mas também por compartilharem seus conhecimentos e jamais terem negado ajuda quando necessário.

À toda minha família, em especial minhas tias Sonia e Cacilda e meu tio Anísio, por sempre estarem em mim atentos e prontos a ajudarem meus pais nos momentos em que precisei estar ausente.

A Deus por sempre iluminar minhas decisões e guiar meus passos em minha jornada.

RESUMO

RECCHIA, G.H. **Identificação de Genes Diferencialmente Expressos em Feijoeiro Envolvidos na Resistência ao Estresse Hídrico**. 2011, 152f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

O Brasil é o segundo maior produtor de feijão, sendo a espécie mais cultivada o *Phaseolus vulgaris* L. Entre as três possíveis safras exploradas no Brasil, aquela que gera a maior produção é a da “seca”. Por outro lado, como a maioria das lavouras emprega pouca tecnologia, um dos problemas desta cultura é o estresse hídrico, que leva a uma redução na produtividade. Dessa forma, a identificação de genes que controlam os mecanismos de defesa e adaptação do feijoeiro à falta de água seria de grande utilidade. Nos últimos anos, muitas informações *ômicas* do feijoeiro foram geradas, criando uma visão integrada deste organismo e oferecendo uma complexa rede de interações entre genes e seus produtos. Este trabalho teve como objetivo central a identificação de genes diferencialmente expressos no sistema radicular de um genótipo de feijoeiro resistente ao estresse hídrico (BAT 477), quando submetido a uma interrupção de irrigação durante seu desenvolvimento. Foi construída uma biblioteca subtrativa de cDNA (SSH), que representou os genes diferencialmente expressos no genótipo resistente, utilizando-se como *driver* o genótipo Carioca 80SH (suscetível a seca). Foram obtidos 1572 *reads* válidos, sendo 931 destes *singletons* e 189 *contigs* com uma média de seis *reads* por *cluster*. A anotação das sequências foi conduzida via BLASTX, sendo consideradas para anotação somente os melhores resultados dos produtos gênicos similares com E-Value $\leq 10^{-5}$. A classificação funcional foi feita tendo-se como base modelos descritos para plantas (modelo CS e MIPS) e os resultados foram agrupados em seis classes funcionais distintas. As análises de bioinformática ajudaram na identificação de genes descritos como envolvidos na resposta da planta ao estresse hídrico. Entre eles: proteínas do grupo LEA; fatores de transcrição como DREB, NAC e proteínas ricas em leucina; enzimas sintetizadoras de carboidratos incluindo trehalose, sacarose e rhamnose; proteínas ricas em prolina; receptores de hormônios (ABA, etileno); aquaporinas; chaperonas; ubiquitinas; nodulinas; e proteínas associadas à fotossíntese e à respiração. A fim de se obter a validação das ESTs anotadas, foi conduzido um experimento de PCR em tempo real confrontando os padrões de expressão de 15 genes sob quatro tratamentos: ambos os genótipos sob estresse e respectivos controles. Três replicatas biológicas foram adotadas e dois genes de referência (*act* e *skip2*) foram escolhidos para normalização interna dos dados. Os padrões de expressão gênica obtidos confirmam a hipótese de que tais genes são mesmo mais expressos no genótipo resistente, embora não sejam exclusivos já que uma quantidade menor de tais transcritos também foi detectada no genótipo suscetível.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Estresse hídrico. cDNA. Biblioteca subtrativa por hibridização.

ABSTRACT

RECCHIA, G.H. **identification of differentially expressed genes in common bean involved in drought stress resistance.** 2011, 152f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Brazil is the second biggest producer of common bean, being *Phaseolus vulgaris* L. the most cultivated species. Among the three possible harvests exploited in Brazil, 'drought' is the one which generates the greatest production. On the other hand, as the majority of the households employees low technology, one of the problems of this culture is drought stress that leads to a reduction in the productivity. So, the identification of gene that controls the mechanisms of defense and adaptation of common bean to the lack of water would be very useful. In the past years, many 'omics' information of common bean have been generated, creating an integrated view of this organism and providing a complex network between genes and its products. The main goal of this work was the identification of differentially expressed genes in a genotype of common bean resistant to drought stress (BAT 477), when submitted to a interruption of irrigation during its development. It was build a cDNA suppression subtractive hybridization library (SSH), which represented the differentially expressed genes, on the resistant genotype, having as 'driver' the genotype Carioca 80SH (susceptible to drought). It was obtained 1572 valid reads, being 931 singletons and 189 contigs, with the average of 6 reads per cluster. The sequences annotation was conducted via BLAST X, considering only the best similarity results with E value $\leq 10^{-5}$. The functional classification was done adopting models described for plants (CS and MIPS) and the results were grouped into six different functional classes. Bioinformatic analyses contributed to the identification of genes described as involved on plants response to drought stress. Among them: LEA proteins; transcription factors like DREB, NAC and leucine-rich proteins; carbohydrates synthesizers enzymes like the ones for trehalose, sucrose and rhamnose; proline-rich proteins; hormone receptors (ABA and ethylene); aquaporins; chaperones; ubiquitins; nodulins; and proteins associated with photosynthesis and respiration. In order to validate the ESTs annotated, a RT-qPCR experiment was conducted comparing the expression patterns of 15 genes under four treatments: both genotypes under stress and their respective controls. Three technical replicates were used and two reference genes (*act* and *skip2*) were chosen for intern data normalization. The gene expression patterns obtained confirm the hypothesis that such genes are more expressed on the resistant genotype although they are not exclusive since a lower levels of these transcripts were also detected in the susceptible genotype.

Key-words: *Phaseolus vulgaris* L.. cDNA. Drought stress. Suppressive hybridization library.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	15
2.1 O feijoeiro (<i>P. vulgaris</i> L.)	15
2.2 A importância econômica e social do feijão	16
2.3 Impacto do estresse hídrico sobre as culturas do feijoeiro	17
2.4 Alterações em padrões de expressão gênica em resposta ao estresse	19
2.5 Respostas gênicas induzidas pelo estresse hídrico	22
2.6 Isolamento de genes responsivos ao estresse: a genômica funcional	25
2.7 Justificativas	28
3. Material E Métodos	31
3.1 Material vegetal e indução dos genes de resistência à seca.	31
3.2 Extração e Purificação de RNA total	34
3.2.1 Extração de RNA	34
3.2.2 Purificação do RNA total	35
3.3 Construção da biblioteca de SSH	35
3.3.1 1ª Fase: Obtenção dos cDNA's	35
3.3.1.1 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD PCR	36
3.3.1.2 Cromatografia de coluna	37
3.3.1.3 Digestão das fitas de 'dscDNA'	37
3.3.2 2ª Fase: Construção da biblioteca subtrativa	38
3.3.2.1 Purificação da digestão e Ligação dos Adaptadores.	38
3.3.2.2 PCR da ligação	39
3.3.2.3 Hibridizações	40
3.3.2.4 Amplificação das seqüências de cDNA diferencialmente expressas	40
3.4 Sequenciamento	41
3.4.1 Preparação dos produtos de PCR subtraídos	41
3.4.2 Protocolo para ligação usando <i>pGEM[®]- T Easy Vector</i>	42
3.4.3 Sequenciamento pelo método <i>Dyenamics[®]</i>	42
3.4.3.1 Transformação bacteriana de células termocompetentes	42
3.4.3.2 Amplificação dos clones com <i>primer</i> M13	43
3.4.3.3 Purificação dos produtos de PCR em Placas <i>96-well</i>	43

3.4.3.4 Reação de sequenciamento	44
3.4.3.5 Precipitação dos fragmentos de DNA (<i>kit Dyenamics</i>)	44
3.4.4 Sequenciamento pelo sistema <i>BigDye v3.1</i>	44
3.4.4.1 Transformação bacteriana de bactérias quimiocompetentes (Método PEG)	44
3.4.4.2 Preparação do DNA plasmidial em placas de <i>96-well</i>	45
3.4.4.3 Protocolo de sequenciamento	46
3.5 Análise das sequências (ferramentas de Bioinformática empregadas)	47
3.6 Anotação das sequências	50
3.7 Validação da biblioteca subtrativa através de quantificação relativa via RT-qPCR	51
3.7.1 Seleção dos genes para análise de expressão relativa em RT-qPCR e otimização dos <i>primers</i>	51
3.7.2 Preparo das amostras para análise de expressão relativa em RT-qPCR	54
3.7.3 Protocolo para reação de RT-qPCR empregando <i>SensiMix™ SYBR One-Step Kit</i>	55
3.7.4 Protocolo para reação de RT-qPCR empregando <i>Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	55
3.7.5 Análise de expressão relativa em RT-qPCR	56
3.7.6 Análise estatística do experimento de expressão relativa em RT-qPCR	57
4. Resultados e Discussão	59
4.1 Material vegetal e indução dos genes de resistência à seca	59
4.2 Extração e Purificação de RNA total	60
4.2.1 Extração e Purificação de RNA total: BAT 477	61
4.2.2 Extração e Purificação de RNA total: Carioca 80SH	63
4.3 Construção da biblioteca subtrativa de cDNA	64
4.3.1 1ª Fase: Obtenção dos cDNA's	64
4.3.1.1 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD PCR	64
4.3.1.2 Cromatografia de coluna	66
4.3.1.3 Digestão das fitas de ' <i>dscDNA</i> '	67
4.3.2 2ª Fase: Construção da biblioteca de SSH	68
4.3.2.1 Purificação da digestão, Ligaçãõ dos Adaptadores e PCR da ligaçãõ	68
4.3.2.2 Hibridizações e Amplificação das seqüências de cDNA diferencialmente expressas	70
4.4 Sequenciamento, trimagem e clusterização	71
4.5 Análise e anotação das sequências	78

4.6 Análise da abundância dos <i>reads</i> nas classes funcionais	81
4.7 Principais Vias de Sinalização: sensores, sinalização em cascata, ativação e repressão de rotas metabólicas	85
4.8 Vias de transdução de sinais: Transdução de sinais iônicos e osmóticos	85
4.8.1 Recepção de estímulos na superfície celular: <i>GTP-binding proteins</i>	85
4.8.2 Carregadores, canais, e bombas operando para minimizar a toxidez iônica.	87
4.9 Síntese e atividade de Aquaporinas	89
4.10 Sinalização de estresse osmótico e oxidativo	90
4.11 Osmólitos: solutos compatíveis	92
4.11.1 Acúmulo de prolina	93
4.11.2 Mudanças nas concentrações de açúcares solúveis: trehalose e sacarose	93
4.12 Sinalização dependente de Ca^{2+} que leva a ativação de genes <i>Lea</i>	95
4.13 A sinalização mediada por Ca^{2+} e a produção de moléculas regulatórias	99
4.14 Regulação da expressão gênica através de fatores de transcrição	100
4.15 As RNA helicases e sua relação com o estresse abiótico	104
4.16 Respostas adicionais a manutenção da homeostase e desintoxicação	106
4.17 Nodulinas e a fixação de N_2 durante o estresse	108
4.18 O efeito da mucilagem e de polissacarídeos na proteção contra dessecação	109
4.19 Ajustes estruturais	110
4.19.1 Parede celular	110
4.19.2 Membrana plasmática	111
4.20 Validação da biblioteca subtrativa através de quantificação relativa via RT-qPCR	113
4.20.1 Seleção dos genes para análise de expressão relativa em RT-qPCR e otimização dos <i>primers</i>	113
4.20.2 Preparo das amostras para análise de expressão relativa em RT-qPCR	115
4.20.3 Análise de expressão relativa em RT-qPCR	118
5. Conclusão	127
REFERÊNCIAS	130
ANEXOS	141

1 INTRODUÇÃO

As plantas frequentemente encontram fontes ambientais externas que causam condições de estresse. Tais condições afetam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Chamamos de estresse abiótico, todo aquele que surge a partir do excesso ou déficit de fatores físicos ou químicos no ambiente. Entre as condições ambientais que podem causar danos às plantas encontramos: excesso de água ou seca, calor ou frio intenso, salinidade excessiva do solo, disponibilidade insuficiente de nutrientes minerais, pouca ou intensa luminosidade. A resistência ou suscetibilidade de uma espécie vegetal ao estresse depende de diversos fatores, sendo os principais o genótipo e o estágio fenológico de desenvolvimento em que esta se encontra.

À medida que a população humana aumenta, a agricultura encontra pela frente o dilema em alimentar mais pessoas ao mesmo tempo em que compete com o desenvolvimento urbano por áreas aráveis de melhor qualidade. Este aumento na demanda por alimentos, aliado a diminuição dos recursos ambientais, tem impulsionado o interesse científico e comercial no sentido de se elucidar os mecanismos pelos quais plantas respondem ao estresse e em manipular estes mecanismos para assim aumentar a produtividade de espécies vitais nas dietas de consumo humano principalmente, em locais cujas condições ambientais são inferiores às ótimas necessárias (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Dentre as principais espécies exploradas pelo homem na alimentação encontram-se as leguminosas. Estas espécies estão entre as mais importantes culturas ao redor do mundo, tendo grande impacto na agricultura, no ambiente, na nutrição humana e animal e na saúde (GRAHAM; VANCE, 2003). Leguminosas podem interagir simbioticamente com um gênero específico de bactérias do solo, *Rhizobia*, que permitem a estas plantas fixarem o nitrogênio atmosférico. Desta forma, estas espécies constituem-se uma significativa fonte de nitrogênio e conseqüentemente desempenham um papel essencial na manutenção da estrutura dos ecossistemas e da agricultura sustentável ao redor do planeta (CHAKRABORTY; SARKAR; CHAKRABORTY, 2003).

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a segunda cultura de leguminosas mais importante no mundo, atrás apenas da cultura da soja (SINGH; MUÑOZ, 1999). Esta cultura é considerada a figura central na dieta diária de mais de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo. O feijão é considerado o 'alimento perfeito' devido ao seu alto conteúdo de proteínas, fibras e minerais (BEEBE; MacCLAFFERTY, 2006). Infelizmente, o estresse hídrico acaba sendo um problema mundial que prejudica a produção dessa cultura. No Brasil, por exemplo, a seca é um problema endêmico e afeta uma das principais áreas produtoras que compreendem mais de 1,5 milhão de ha no nordeste do país (TERÁN; SINGH, 2002).

Níveis moderados a intensos de estresse hídrico sobre a cultura do feijoeiro levam a reduções na biomassa, no número de sementes por vagens, dias para se atingir a maturação, nos índices de colheita, na produção e no peso das sementes (RAMÍREZ-VALLEJO; KELLY, 1998). Casos já foram relatados em que níveis severos de estresse hídrico levaram a uma redução de 92% na produção de grãos e quando ocorreram durante a fase reprodutiva levaram a uma redução média de 43% na nodulação e, conseqüentemente, a uma queda nos valores de fixação de nitrogênio para um sexto da taxa obtida normalmente sob condições ótimas de irrigação (CASTELLANOS; PEÑA-CABRIALES; ACOSTA-GALLEGOS, 1996).

Estresses desencadeiam uma ampla gama de respostas na planta, desde alterações nos padrões de expressão gênica e no metabolismo celular até mudanças no crescimento e produção (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Sabemos que a duração, a severidade, e as taxas com que um estresse é imposto sob uma cultura influenciarão o padrão de resposta da planta. Tentar, portanto entender como genótipos considerados resistentes respondem ao estresse é algo vital para se desenvolver estratégias a fim de selecionar genes que possam ser úteis para se estabelecer programas de melhoramento genético de culturas vitais para a alimentação humana.

Partindo-se da hipótese de que a ativação diferencial de diversas vias de transdução de sinais metabólicos levem a alterações no padrão de expressão de

genes vitais para a resposta do feijoeiro ao estresse hídrico, este projeto busca, através de técnicas de análise de expressão gênica diferencial, contrastar dois genótipos de feijoeiro cultivados sob déficit hídrico, sendo um resistente (BAT 477) e outro suscetível (Carioca 80SH), e assim determinar quais os mecanismos que se encontram presentes na resposta da cultivar BAT 477 que tornam um modelo de resistência.

Neste estudo foi empregada a técnica de construção de bibliotecas subtrativas por hibridização (SSH) contrastando ambos os genótipos. Esta técnica foi escolhida uma vez que o objetivo principal deste projeto não era traçar um perfil transcricional da espécie, mas sim identificar os genes que são diferencialmente expressos em genótipo resistente quando submetido ao estresse, inclusive aqueles ainda não descritos. Com isto, novas informações a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância à seca do feijoeiro puderam ser geradas e, quando analisadas em conjunto com os dados já disponíveis, poderão indicar genes candidatos tanto para uso como marcadores moleculares, quanto para transformação genética. Os dados obtidos com a construção da biblioteca subtrativa foram validados por meio de experimentos de RT-qPCR utilizando as ESTs mais abundantes (freqüentes) encontradas na coleção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O feijoeiro (*P. vulgaris* L.)

O feijoeiro (*P. vulgaris* L.) é um membro da família Fabaceae, subfamília Faboideae. As formas cultivadas são anuais, herbáceas e com hábitos de crescimento determinados e indeterminados. Durante a germinação a planta possui inicialmente uma raiz pivotante, porém raízes adventícias emergem em seguida e dominam a raiz pivotante axial, sobrando apenas de 10 a 15 cm desta (DUKE, 1981). Flores papilionáceas bastante características surgem a partir de racemos axilares e terminais, sendo que estes podem conter de uma a muitas flores. As flores são zigomórficas, com uma quilha bi-petalada, duas asas laterais e uma larga pétala pronunciada. As cores das pétalas são independentes geneticamente da cor das sementes, porém correlações positivas deste tipo podem ocorrer. As flores podem ser brancas, rosas ou roxas, contém dez estames e um único ovário multi-ovulado predominantemente auto-fertilizável e se desenvolvem em uma vagem estreita, cumprida e curvada. Sementes podem ser arredondadas, elípticas, compridas ou cheias, e possui um amplo padrão de colorações. O tamanho das sementes varia de 50 mg por semente nos acessos selvagens coletados no México, até mais de 2000 mg por semente em variedades colombianas (DEBOUCK, 1991).

A germinação em *P. vulgaris* é epígea, requerindo de 5-7 dias a temperatura do solo de 25°C. O florescimento se inicia comumente de 28-42 dias após o plantio, mas dentro das variedades de hábito epifítico esse prazo se estende para períodos mais elevados. O período de florescimento em cultivares do tipo I de crescimento é concentrado em um período de tempo muito curto (5-6 dias), tendo a seca ou outros fatores de estresse impostos à planta nesse período um forte impacto na produção. Em geral, cerca de dois-terços do total de flores produzidas por plantas sofrem abscisão, e sob estresses de temperatura ou falta de água frutos jovens e/ou sementes em desenvolvimento podem abortar (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, 1975).

O desenvolvimento das sementes pode se estender por 23 dias no caso de cultivares de hábito de crescimento determinado e aproximadamente 50 dias nas espécies com hábitos indeterminados. O estado de maturidade fisiológica, ou seja, o estado onde não ocorre mais ganho significativo no tamanho das sementes, pode ocorrer entre 60-65 dias após o plantio naquelas variedades cultivadas em áreas onde a estação de cultivo é menor, ou se estender a até 200 dias para as variedades de hábito epifítico cultivadas em regiões de elevadas altitudes e climas mais frios (GRAHAN; RANALLI, 1997).

2.2A importância econômica e social do feijão

Inicialmente uma cultura característica do Novo Mundo, o feijoeiro é agora cultivado extensivamente em praticamente todos os continentes do mundo (GRAHAN; RANALLI, 1997). Sua produção se espalha desde 52°N até 32°S de latitude (van SCHOONHOVEN; VOYSEST, 1991), e de regiões litorâneas nos EUA e Europa até elevações de mais de 3000 m nos Andes, na América do Sul. Caracteriza-se por ser a principal fonte protéica na dieta de populações que ocupam a América Latina e a região Leste da África (BEEBE et al., 2009), porém o consumo *per capita* vem declinando na medida em que o aumento populacional vem sobrepujando a produção (GRAHAN; RANALLI, 1997).

As condições sobre as quais esta cultura, anual e predominantemente autopolinizável, é cultivada são extremamente variáveis. Enquanto sua produção tende a ser centralizada em pequenas áreas, o sistema de plantio utilizado pode variar de amplamente mecanizado, irrigado e de intensa produção, para complexos de associação entre feijoeiros de hábito epifítico em conjunto com milho, outros cereais, cana-de-açúcar ou café (GRAHAN; RANALLI, 1997).

A diversidade de condições sobre as quais o feijoeiro é cultivado, aliado às preferências locais bastante altas por tipos específicos de sementes tem complicado as tentativas de melhoramento genético da cultura. Como resultado, apesar de grandes avanços em cruzamentos para a resolução de problemas relacionados a

estresses abióticos como a seca, além de doenças, insetos e conteúdo nutricional, pouco vem sendo alcançado no sentido de aumentar os números de produção (GRAHAN; RANALLI, 1997).

Planos de melhoramento genético para a obtenção por parte das cultivares comerciais de resistência para a maioria destes estresses estão em curso. Marcadores moleculares para genes de resistência tem sido identificados e implementados em muitos casos (MIKLAS et al., 2006). Muitos genes importantes de resistência vêm sendo incorporados em cultivares comerciais que possam ser prontamente utilizada pelos agricultores facilitando em muito o progresso das técnicas de melhoramento no sentido de se obter variedades mais resistentes (BEEBE et al., 2009).

No mundo todo, algo em torno de 12 milhões de toneladas de feijão são produzidas ao ano, sendo que destas, 8 milhões de toneladas são produzidas na América Latina e África (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005). Para a safra 2010/2011, segundo dados publicados pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a produção brasileira teve um acréscimo de 10,6%, o que resultou numa produção total de 1,4 milhões de toneladas (CONAB, 2011). Com exceção do Rio Grande do Sul e São Paulo, todos os principais estados produtores indicaram plantio de áreas maiores do que as cultivadas na safra anterior. Nestes locais, 70% da safra plantada entre setembro/outubro são dependentes da água da chuva e estas tiveram um acentuado atraso este ano devido ao fenômeno meteorológico *La Niña* (CONAB, 2011). Exatamente devido a este motivo, espera-se que para o ano de 2011 não só ocorra uma alta nos preços dos grãos, como novas rotas de importação com EUA e Canadá devam ser estabelecidas (CONAB, 2011).

2.3 Impacto do estresse hídrico sobre as culturas do feijoeiro

Considerando-se a diversidade fisiográfica do Brasil e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, é possível explorar a cultura em três épocas diferentes, no mesmo ano. A safra "das águas", cujo plantio é feito de agosto

a novembro, com predominância na Região Sul; o plantio "da seca", realizado de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores; e "de inverno", de abril a julho, realizada nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste (EMBRAPA, 2007).

A maior parte da produção nacional é proveniente das duas primeiras safras, de lavouras de pequenos produtores, com baixo ou nenhum nível tecnológico. Altas produtividades são alcançadas somente pelas lavouras altamente tecnificadas, que utilizam grandes sistemas de irrigação. Um dos principais problemas enfrentados pelos pequenos produtores é o déficit hídrico. Essa cultura requer entre 200 e 400 mm de água durante seu crescimento e desenvolvimento, mas estima-se que mais de 73% do total da produção na América Latina e 40% do total na África ocorram sob condições micro-climáticas que apresentam de moderado a severo déficit hídrico em algum momento durante seu cultivo (BROUGHTON et al., 2003).

O estresse hídrico afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e da raiz das plantas, causando redução na expansão celular, condutância estomática, fotossíntese e, conseqüentemente, no acúmulo de matéria seca (HSIAO, 1990). Muitos estudos vêm sendo conduzidos no sentido de aumentar o desempenho do feijoeiro sob estresse hídrico (SHNEIDER; BROTHERS; KELLY, 1997). Morfologicamente, redução da área foliar é a resposta mais importante ao estresse em feijoeiro e pode ser resultante da redução no número de folhas, redução no tamanho das folhas jovens, inibição da expansão foliar dos folíolos em desenvolvimento, ou mesmo, a perda acentuada de folhas impulsionada por adiantamento na ocorrência de senescência, todos estes sendo fatores que levam a queda na produção (SHNEIDER; BROTHERS; KELLY, 1997).

Sob estresse hídrico severo o feijoeiro passará também a ficar sujeito a redução na mobilização de nitrogênio, diminuição no percentual de produção e na eficiência quanto ao uso da água disponível. Segundo Shneider, Brothers e Kelly (1997), variações em genes que condicionam para o movimento do ângulo foliar, alteração esta citada como um mecanismo de resistência ao estresse hídrico, foi relatado em genótipos de origem Andina. Variações genéticas que condicionam para o estiolamento parecem ter menos importância do que variações genéticas para o enraizamento para a resistência à seca. Outro fator que contribui para um aumento

na performance do feijoeiro sob estresse hídrico é a plasticidade fenotípica, característica essa que permite aos genótipos reduzirem drasticamente seus ciclos de crescimento, fator este útil para adiar datas de plantio e assim evitar épocas de seca (SHNEIDER; BROTHERS; KELLY, 1997).

Diversas condições ambientais podem conduzir ao déficit hídrico em plantas (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Períodos de poucas chuvas, ou mesmo de completa estiagem, levam a condição meteorológica que denominamos seca. Períodos prolongados de seca reduzem a quantidade de água disponível para o crescimento das plantas. Entretanto, o déficit hídrico pode também ocorrer em ambientes onde a água não é limitante. Em habitat salino, a presença de altas concentrações de sal faz com que se torne mais difícil para que as raízes das plantas absorvam água do ambiente. Baixas temperaturas, também resultam em estresse hídrico. Por exemplo, a exposição a temperaturas de congelamento podem levar à desidratação celular na medida em que a água abandona as células e forma cristais de gelo nos espaços intercelulares. Ocasionalmente, plantas bem irrigadas evidenciarão sinais periódicos de déficit hídrico como perdas de turgor no meio do dia. Neste caso, a murcha indica que a perda de água por transpiração acabou por exceder o ganho por absorção (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

2.4 Alterações em padrões de expressão gênica em resposta ao estresse

A resistência ao estresse hídrico é também uma função multi-gênica dependente de várias características fisiológicas e morfológicas da planta, portanto genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica (PIMENTEL et al., 1990).

A resposta ao estresse é iniciada quando a planta o reconhece a nível celular (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Os mecanismos de reconhecimento do estresse ativam as chamadas '*vias de transdução de sinais*', rotas de sinalização interligadas na forma de uma 'rede' que transmitirão informações para o interior das células, bem como por toda a planta. Em um último

nível, estes sinais irão promover mudanças no padrão de expressão gênica basal da planta. Tais mudanças irão, em um último nível, modificar os padrões de crescimento, desenvolvimento e inclusive suas capacidades reprodutivas. Como mencionado anteriormente, será a duração e a severidade do estresse que irão ditar a escala e o tempo para a resposta (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Em plantas, segundo Rodríguez, Canales e Borrás-Hidalgo (2005), as vias de transdução de sinais para a resposta aos estresses hídrico, ao frio e sal são muito parecidas e são subdivididas em três grandes tipos de sinalização (Figura 1): (1) sinalização aos estresses osmóticos e oxidativos que usam os módulos MAPK e envolvem a geração de enzimas de busca a espécies reativas de oxigênio (EROs), além de compostos anti-oxidantes e osmólitos; (2) sinalização dependente de Ca^{2+} que levam a ativação dos genes *Lea* (*late embryogenesis abundant*) e também estão envolvidos na síntese de diversas proteínas responsivas ao estresse; e (3), sinalização dependente Ca^{2+} (SOS), que surge do desbalanceamento iônico e envolve a manutenção da homeostase celular.

Estas intrincadas vias de sinalização, que aparentemente tem vital importância na alteração de padrões de expressão gênica em resposta ao estresse, ainda não foram totalmente elucidadas. Entretanto, evidências indicam que o processo de regulação das respostas da planta ao estresse envolvem hormônios, tais como o ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico e etileno, além de mensageiros secundários como os íons Ca^{2+} (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

Em resposta ao estresse, alguns genes têm seus níveis de expressão aumentados, enquanto outros reprimidos (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Os produtos protéicos destes genes frequentemente são acumulados durante tais condições não favoráveis e suas funções, bem como os mecanismos que regulam sua expressão, são tema recorrente de pesquisas sobre a fisiologia do estresse (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Embora a maioria dos estudos tenha focado na ativação transcricional da expressão gênica, evidências crescentes sugerem que o acúmulo de produtos gênicos é também

influenciado por mecanismos regulatórios pós-transcripcionais que aumentam a quantidade de mRNAs específicos, aumentam a tradução, e estabilizam e alteram a atividade de proteínas (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

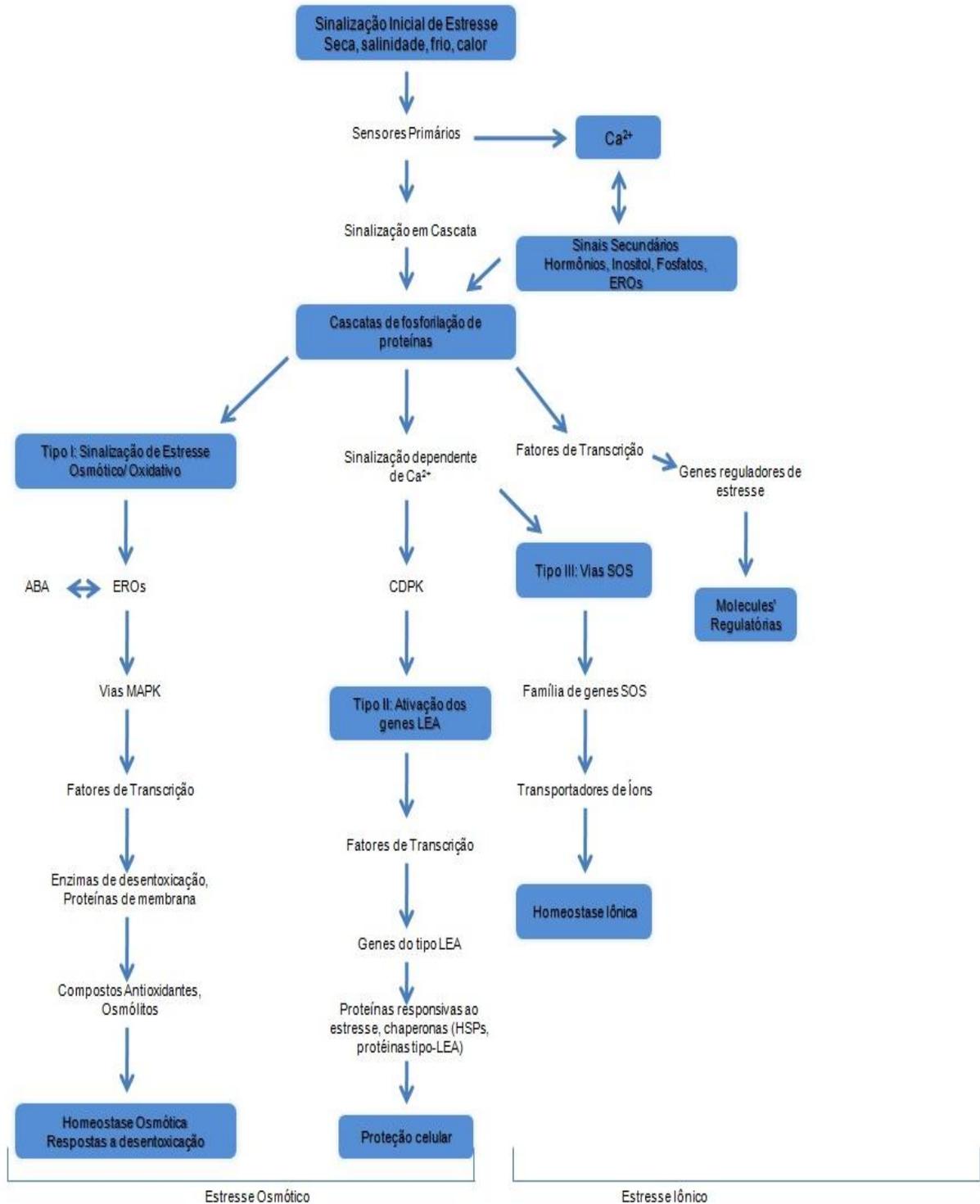


Figura 1 - Via esquemática para a transdução de sinais hídrico, salino e temperatura em plantas.

Fonte: adaptado de Rodríguez, Canales e Borrás-Hidalgo, (2005)

2.5 Respostas gênicas induzidas pelo estresse hídrico

Diferentes técnicas de análise de expressão gênica a partir de cDNA tem sido utilizadas para identificar genes que são diferencialmente regulados durante períodos de déficit hídrico. Estas análises têm permitido o isolamento de muitos genes de função ainda desconhecida; estudos ainda estão sendo conduzidos para se determinar como as proteínas codificadas por estes genes agem durante o estresse hídrico (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Quando a água se torna um fator limitante, plantas tornam-se mais suscetíveis a outros estresses. Segundo Rodríguez, Canales e Borrás-Hidalgo (2005), quando expostas à luz, plantas dissipam calor principalmente através da transpiração, um processo que é inibido pelo estresse hídrico, portanto estresse por calor acompanha o estresse hídrico. Ainda, o estresse hídrico pode também levar ao aumento na presença de EROs (SUNKAR; BARTELS; KIRCH, 2003), e aumentar assim a suscetibilidade a patógenos. Desta forma, alguns produtos gênicos induzidos pelo estresse hídrico podem funcionar primariamente para minimizar outros estresses, e muitos deles aparentam possuir múltiplos papéis na proteção contra estresses (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

Muitos dos genes induzidos em resposta ao déficit hídrico são regulados a nível transcricional. Diversos dos genes induzidos por estresses são regulados pela presença do hormônio ABA cuja concentração é aumentada em resposta ao déficit hídrico e em baixas temperaturas (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). O papel desempenhado por este hormônio em plantas sob estresse hídrico está principalmente relacionado ao fechamento estômatal e a indução da expressão gênica. Mutantes de *Arabidopsis*, milho e tomate que apresentavam produção reduzida desse hormônio, também apresentaram dificuldades para expressar diversos genes associados ao estresse hídrico. Quatro genes em *flacca*, um mutante de *Arabidopsis* com deficiência para a produção de ABA, não foram expressos até que uma quantidade de ABA exógeno foi aplicado. Os produtos destes genes incluíam duas proteínas LEA (Grupos 2 e 5), uma proteína transferidora de lipídios, e uma isoforma de histona H1 induzida pelo estresse (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Em *P. vulgaris* L., Torres et al. (2006) utilizou DDRT (*differential display RT-qPCR*) para analisar raízes de plantas cultivadas em sistema aeropônico e submetidas à desidratação e subsequente tratamento com ABA exógeno. Neste trabalho foram obtidos 42 clones de cDNA, sendo que 20 deles foram selecionados como sendo induzidos ou reprimidos antes de poder ser detectado alguma modificação significativa na disponibilidade de água ou aumento na concentração de ABA. Análise em 16 destes clones confirmaram seu papel na pré-regulação, permitindo a identificação de quatro genes de resistência ao estresse hídrico. Seu envolvimento na sinalização, modificações estruturais protéicas, translocações, chaperonamento de proteínas e modulação do crescimento radicular também foram evidenciados.

Outros mecanismos de percepção que estão sendo estudados hoje em plantas são a atividade de quinases e de fatores de transcrição como as proteínas DREB (*Dehydration Responsive Elements Binding proteins*), que aderem a seqüências de DNA presentes em regiões promotoras de genes expressos durante a desidratação (KASUGA et al., 1999). O fator de transcrição *GmDREB2* (*dehydration responsive element binding protein*) de soja foi isolado e superexpresso em *Arabidopsis* e tabaco. Sua expressão foi induzida por tratamentos de seca, alta concentração salina, baixas temperaturas e ácido abscísico, e o aumento em sua expressão levou a um aumento na expressão de genes já descritos como *downstreams* para o gene *AtDREB1* em *Arabidopsis* (CHEN et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores observaram o acúmulo de altos níveis de prolina livre, sugerindo que o *GmDREB2* também ative a expressão de alguns genes envolvidos na biossíntese de prolina.

Um grupo de genes considerado como adaptativos à seca e que têm sido identificados em vários trabalhos que analisam respostas de plantas à falta de água, codifica para as já citadas proteínas LEA (*late-embriogenesis abundant*). Estas proteínas foram inicialmente identificadas como produtos de genes induzidos durante a maturação e dessecação de sementes, porém estudos posteriores indicaram um aumento de sua concentração em tecidos vegetais expostos ao déficit hídrico (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). As prováveis funções

destas proteínas em sua maioria hidrofílicas são relacionadas com seqüestro de íons, proteção de membranas, dobramento de proteínas (chaperonas) e retenção de água (BRAY, 1993; DURE, 1993; ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997).

Colmenero-Flores et al. (1997) identificaram duas proteínas LEA através da caracterização de seis clones de cDNA de *Phaseolus vulgaris* responsivos ao déficit hídrico, sendo que uma destas duas proteínas identificadas corresponde a uma isoforma que não havia sido previamente descrita de 9,3 kDa. Além disso, foram também identificadas uma proteína *heat shock* classe I de baixo peso molecular e duas proteínas ricas em prolinas (PRP). O acúmulo de prolina em células vegetais submetidas a estresse hídrico tem sido sugerido como um mecanismo de ajuste osmótico (DELAUNEY.; VERMA, 1993), mas também pode ter funções na estabilização de estruturas sub-celulares, no depósito de energia, como componentes de cascatas de sinalização molecular do estresse, e na constituição da parede celular das plantas uma vez que é um dos seus constituintes principais (NEPOMUCENO et al., 2001).

Durante o estresse também tem sido observado o acúmulo de aquaporinas na membrana do vacúolo. Estas proteínas promovem o movimento da água e dos solutos do vacúolo para o citoplasma, alterando tanto o teor de água quanto o potencial osmótico do citoplasma (MAUREL et al., 1993). Peng et al. (2007), superexpressaram uma aquaporina (*PgTIP1*) em *Arabidopsis* e observaram um aumento significativo no crescimento da planta quando submetida ao estresse hídrico. Através da construção de bibliotecas subtrativas de cDNA contrastando variedades tolerantes e suscetíveis ao estresse hídrico, Montalvo-Henández et al. (2007) foram capazes de identificar 18 clones de cDNA sendo um deles referente a uma nova aquaporina. Além disso, sob estresse hídrico foi evidenciado que os níveis de mRNAs de aquaporinas conhecidas decaíram para níveis impossíveis de serem identificados na cultivar suscetível; por outro lado, os níveis de mRNA para estas mesmas aquaporinas mantiveram-se estáveis em tecidos do floema na variedade resistente.

A soja já foi modificada geneticamente com o gene *DREB* por pesquisadores da EMBRAPA/Soja com o intuito de obter uma variedade tolerante à estiagem.

Experimentos com trigo, milho, arroz e tabaco também já foram realizados e testados em campo. Assim como em outras culturas, a tolerância ao estresse hídrico é uma das principais características buscadas pelos melhoristas do feijoeiro. As técnicas moleculares têm fornecido novas informações aos programas de melhoramento, o que tem mudado a escala de análise de genes, de seus níveis de expressão e de proteínas. Técnicas de Genômica, Transcritômica e Proteômica já têm sido aplicadas no estudo do feijoeiro, sendo encontradas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) 235.724 seqüências provenientes de *P. vulgaris*, das quais 5.193 são de cDNAs completos, 138.405 são de ESTs e 92.126 são sequências de DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?term=phaseolus%20vulgaris>). Além disso, o genoma completo do cloroplasto do feijoeiro também está disponível publicamente.

2.6 Isolamento de genes responsivos ao estresse: a genômica funcional

Análises de perfis de expressão gênica têm se tornado uma importante ferramenta para se investigar como um organismo responde a alterações ambientais (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Perfis de expressão podem definir se um dado genótipo é tolerante ou suscetível a um estresse. É esperado que estes perfis de expressão oferecidos por tais estudos nos levem a definição de agentes reguladores que serão extremamente úteis não somente no estabelecimento de abordagens biotecnológicas para o aumento da tolerância ao estresse hídrico por parte das plantas, mas também para o desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo de tais circuitos genéticos regulatórios (HAZEN; WU; KREPS, 2003).

O isolamento e a clonagem de genes através da pesquisa em biologia molecular podem ser baseados na expressão de moléculas de RNAs ou proteínas, análise diferencial (*differential screening*), inserções de DNA como transposons ou T-DNA, clonagem baseadas em mapas e métodos de sequenciamento aleatório de cDNA e sequenciamento genômico. O crescente aumento nas atividades relacionadas com a identificação de genes com funções desconhecidas, através da

pesquisa com ESTs e no sequenciamento de genomas totais, representa um grande avanço na pesquisa da fisiologia do estresse. Entretanto, genes identificados, isolados e clonados através de tais abordagens precisariam ser totalmente caracterizados (GROVER et al., 1999).

Diversas técnicas vêm sendo empregadas para identificar os genes cuja expressão é diferencialmente regulada em resposta a vários dos estresses ambientais. Tais métodos incluem a análise diferencial em reação de cadeia de polimerase (DDPCR – *differential display PCR*), construção de bibliotecas subtrativas por hibridização (SSH – *suppression subtractive hybridization*), análise serial da expressão gênica (SAGE), *chips* de DNA e microarranjos, e AFLP (*cDNA amplified fragment length polymorphism*) (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

Para se entender a regulação molecular da resposta ao estresse, os conjuntos mais relevantes de genes diferencialmente expressos devem ser identificados, clonados, e estudados em detalhe. Bibliotecas SSH tem se tornado uma poderosa técnica para se identificar e isolar cDNAs de genes diferencialmente expressos. Em geral, esta metodologia envolve a hibridização de cDNA de uma população (amostra *tester*) com um excesso de cDNA de uma outra população (amostra *driver*) e então a separação e seleção dos cDNAs não hibridizados da amostra desejada (*tester*). Estas técnicas subtrativas frequentemente requerem em torno de 2 µg de RNA-poli(A), envolvem múltiplos passos de subtração e dependem bastante trabalho e tempo, porém geram um valioso conjunto de dados de expressão gênica diferencial entre genótipos de padrões diferentes de resposta (DIATCHENKO et al, 1996).

Tais técnicas, apesar de oferecem dados importantes sobre perfis transcricionais, carecem de estratégias complementares mais acuradas no sentido de validação dos genes obtidos (GIULIETTI et al, 2001). Neste sentido a invenção da PCR em tempo real (RT-qPCR) revolucionou o campo das análises de expressão gênica em organismos vivos (JAIN et al., 2006). Esta técnica é extremamente sensível, específica, e aumenta a amplitude de quantificação gênica para até sete ordens de magnitude (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004). PCR em tempo real

é a técnica de se coletar dados através do processo de PCR enquanto este ocorre, combinando desta forma amplificação e detecção num único passo (WONG; MEDRANO, 2005). Isto é possível usando-se uma variedade de substâncias químicas diferentes que correlacionam a concentração de produtos existentes de PCR com a intensidade da fluorescência (HIGUSHI et al., 1993). As reações são caracterizadas pelo ponto no tempo (ou ciclo da PCR) onde a amplificação do gene alvo é inicialmente detectada. Este valor é usualmente conhecido como Ct (*cycle threshold*), ou seja, o momento em que a intensidade de fluorescência é maior que a do ruído do aparelho (WONG e MEDRANO, 2005). Consequentemente, quanto maior a quantidade do gene alvo presente na amostra inicial, mais rápido ocorrerá um aumento significativo no sinal de fluorescência, gerando um Ct menor (HEID et al., 1996).

Com o desenvolvimento das tecnologias genômicas, a caracterização de genes sofreu um grande avanço. Descobertas de elementos promotores regulatórios, como DRE e ABRE, ambos envolvidos na expressão de genes sob efeito de estresse hídrico em *Arabidopsis*, assim como a identificação de fatores de transcrição interagindo com estes promotores, são de extrema importância. A caracterização de genes envolvidos na fase inicial de resposta ao estresse deveriam ser de máxima prioridade, já que eles são a chave principal para respostas genômicas globais que devem envolver milhares de genes (RIBAUT; BANZIGER; HOISINGTON, 2002).

O campo da genômica funcional providencia informações úteis através de experimentos que traçam perfis transcricionais e/ou aqueles que elegem genes candidatos baseados na localização genômica ou em uma função de interesse. A abordagem de genes candidatos para se identificar vias de resposta ao estresse é facilitada pelo enorme número de sequências com informações disponíveis gratuitamente em bancos de dados públicos (SEKI et al., 2001).

Existem duas abordagens para se estudar a função de proteínas associadas ao estresse. Uma, chamada de abordagem induzida, considera as proteínas de estresse que são induzidas nas células durante o estresse. A outra, a abordagem funcional, considera as proteínas de estresse como aquelas que são cruciais para a

defesa celular contra um estresse em particular (SERRANO et al, 2003). A abordagem funcional assegura que mutações em genes que codificam para proteínas de estresse resultam em padrões de resposta e tolerância alterados. Proteínas funcionais de estresse podem ser constitutivas e se tornam ativas durante o estresse por modificação, ao invés de síntese. Portanto, é a abordagem funcional que poderá oferecer as ferramentas para a engenharia genética de genótipos com capacidade melhorada de resistência ao estresse (SERRANO et al., 2003).

Uma outra possível maneira de se entender o papel destes genes na resposta ao estresse é através da estimulação ou repressão de seus padrões de expressão em transgênicos. Seria extremamente interessante, não somente poder analisar como estes diferentes produtos gênicos interagem, mas também visualizar como estes transgênicos reagem ao estresse no campo. Infelizmente, as respostas gênicas ao estresse são ainda muito complexas para serem controladas e engenheiradas. As estratégias atuais de engenharia genética se baseiam na transferência de um ou vários genes que ou estão envolvidos em vias de sinalização e regulação, ou que codificam enzimas presentes em vias levando à síntese de agentes protetores funcionais e/ou estruturais, tais como osmolitos e anti-oxidantes, ou que codificam proteínas que conferem resistência ao estresse. Os esforços atuais para melhorar a tolerância ao estresse através da transformação gênica vêm resultando em importantes avanços, entretanto, a natureza complexa dos mecanismos genéticos de resistência e os efeitos colaterais ainda hoje tornam esta abordagem algo extremamente difícil (WANG; VINOGRAD; ALTMAN, 2003).

2.7 Justificativas

Para a execução deste projeto de pesquisa, foram adotados dois genótipos de feijoeiro contrastantes quanto à suas capacidades de resistir ao estresse hídrico. Como modelo de resistência foi selecionado o genótipo BAT 477, uma linhagem avançada lançada pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), derivada do cruzamento (G 3834 X G 4493) x (G 4792 X G 5694) e foi selecionado pelo seu crescimento e capacidade de fixação de nitrogênio em simbiose com *Rhizobium* sob

solos com deficiência de P e sob condições de estresse hídrico (LYNCH; WHITE, 1992; TANG et al., 2004; JEBARA et al., 2005). O genótipo IAC-Carioca 80SH foi adotado como modelo de genótipo pouco eficiente sob estresse hídrico. Esta abordagem se deve principalmente ao fato deste genótipo não somente ser um dos mais amplamente cultivados entre os agricultores nas lavouras do estado de São Paulo, mas por ser constante alvo da falta de chuvas em épocas de plantio, que prejudicam seriamente sua produção (Barbano et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e indução dos genes de resistência à seca.

Sementes de dois genótipos de *P. vulgaris* L., um tolerante (BAT 477) e outro suscetível (Carioca 80SH) ao estresse hídrico foram selecionadas para a condução dos experimentos em casas de vegetação. Os experimentos foram conduzidos de janeiro a março de 2009, em casa de vegetação localizada no CENA-USP, Piracicaba, SP. Foram estabelecidos quatro tratamentos, cada um deles contendo 30 vasos distribuídos por entre quatro bancadas na casa de vegetação (Figura 2). Os quatro tratamentos estabelecidos foram: BAT 477 sob estresse, BAT 477 sem estresse (controle), Carioca 80SH sob estresse e Carioca 80SH sem estresse (controle). Foram preparados 30 vasos para cada tratamento, assegurando-se assim um número suficiente de plantas para se montar um *bulk* de material vegetal ao final de cada dia de coleta.



Figura 2 - Disposição dos vasos na casa de vegetação

Foram inicialmente plantadas três sementes por vaso; após a germinação duas plântulas foram removidas por meio de seleção visual deixando-se apenas

uma. Ambos os tratamentos e seus respectivos controles foram cultivados sob condições normais de irrigação, recebendo cada vaso a quantidade exata de 300ml de água por dia até atingirem a fase R5 de seu ciclo fenológico. A fase R5, de acordo com a escala fenológica do feijoeiro desenvolvida pelo CIAT (CIAT, 1983), é a fase onde surgem os primeiros botões florais e notoriamente a fase onde a planta sofre mais profundamente os efeitos adversos provocados pelo estresse hídrico, portanto a fase onde os mecanismos gênicos responsivos estariam mais ativos (AMORIN NETO et al., 1996).

Após atingido o estágio R5, todos os vasos dos tratamentos 'com estresse' tiveram seu suprimento de água interrompido, sendo as coletas do material vegetal iniciadas 24 horas após o ψ_w atingir 0,35 MPa. O monitoramento da umidade do solo foi feito coletando-se amostras de solo de cinco vasos 'com estresse' e contrastando seu peso com o de amostras iguais de solo de cinco vasos 'sem estresse'. A coleta de solo era conduzida com o auxílio de um tubo de PVC de 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura; após coletada a amostra era coletada em placas de Petri e pesadas para a determinação de seu 'peso úmido' (P_u), em seguida as placas eram deixadas 24 horas em estufa para a completa evaporação da água e pesadas novamente para a obtenção do 'peso seco' (P_s). Ambos os valores, P_u e P_s , eram então contrastados ($P_u - P_s = P_a$) para a obtenção de P_a , ou 'peso água'. Após descontado de P_s o peso real de cada placa de Petri obtendo-se o peso seco real de cada amostra (P_{sr}), o teor de umidade do solo (Umidade %) era obtido através da equação: $(P_a/P_{sr} * 100)$. Com os valores de umidade do solo em mãos foi feita uma média deste em cada um dos tratamentos para monitoramento (U% médio).

As coletas foram iniciadas 24 horas após BAT 477 atingir U% médio = 25,06 e Carioca = 25,92. Foram conduzidas quatro coletas de material vegetal, cada uma procedida com 48 horas de diferença uma da outra e intercalada com coletas de amostras de solo para monitoramento de U% médio. A cada coleta eram recolhidos materiais vegetais a partir de cinco vasos por tratamento, sendo montados *bulks* de raízes para o presente trabalho, por ser este o órgão conhecido por sofrer maiores alterações anatômicas e fisiológicas durante o período de estresse, além de caule e folha para estudos posteriores (Figura 3).



Figura 3 - Coleta de raízes. Depois de atingido o U% médio (pesagem do solo e tensiômetros) próximo ao PMP das folhas, as raízes foram removidas manualmente, limpas utilizando-se pincel, embaladas em sacos de alumínio e congeladas em nitrogênio líquido para transporte

Os materiais vegetais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *ultrafreezer* (-80°C) (Figura 3). Para a coleta das raízes foi realizada uma remoção dos torrões de terra com auxílio de pincel, já que elas não poderiam ser lavadas, pois o contato com a água poderia despertar mecanismos de reidratação que interfeririam nos níveis de expressão de genes responsivos à seca. Na seqüência, cada material foi macerado em laboratório com o uso de cadinhos de porcelana esterelizados e nitrogênio líquido, e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

3.2 Extração e Purificação de RNA total

Para a construção da biblioteca de SSH foram selecionadas as amostras de raízes de ambas as variedades tratadas 'com estresse' e obtidas no terceiro dia de coletas (16/02/2009), por apresentarem U% médio relativamente baixo, porém ainda não o suficiente para atingir ponto de murcha permanente (PMP) de acordo com a literatura (GARCIA e ANDRÉ, 2002), portanto estando perfeitamente responsivas ao estresse hídrico.

3.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA total dos *bulks* obtidos a partir das amostras 'com estresse' de BAT 477 e Carioca 80SH foi conduzida utilizando o reagente Trizol (*Trizol[®]LS Reagent*) seguindo informações da fabricante Invitrogen. Para se adequar às nossas necessidades, foram necessárias algumas modificações para a otimização do protocolo: Com o uso de vórtex foram homogeneizadas 100mg de amostra de tecido de raiz devidamente macerada em 1 ml de reagente TRIZOL por 1 min; As amostras foram posteriormente incubadas por 5 min a temperatura ambiente seguida da adição de 0,2 ml de clorofórmio; Em seguida as amostras foram misturadas manualmente por inversão, por 15 seg e incubadas a temperatura ambiente por período de 2-3 min; As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4°C; Após este passo as amostras foram mantidas em gelo; As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo (RNase-free); A precipitação do RNA foi feita misturando a solução aquosa com 0,35 ml de isopropanol e incubadas por 10 min; As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 14000 rpm e 4°C para a formação do precipitado; Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado por 5 min a 14000 rpm e 4°C; O etanol foi descartado, o precipitado seco por 10 min a temperatura ambiente (ainda em gelo e com auxílio de micropipeta), ressuspendido em 20 µl de Água DEPC 0,1% e armazenado a -80°C.

Antes do armazenamento, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm utilizando equipamento *Nanodrop*[®] *ND 1000* de acordo com especificações para quantificação de ácidos nucleicos recomendadas pelo fabricante e posteriormente a qualidade do material foi analisada em gel de agarose 1,6%.

3.2.2 Purificação do RNA total

As amostras de RNA total referentes a BAT 477 e Carioca 80SH foram então reunidas (amostras de BAT 477 e Carioca 80SH separadamente) para obter uma solução contendo 75 µg de RNA total em 100 µl de Água DEPC 0,1%. Em seguida, foram purificadas para a obtenção de mRNA utilizando o kit de purificação da Invitrogen *Dynabeads*[®] *mRNA Purification Kit* de acordo com as instruções de catálogo do fabricante (Cat. No. 610.06).

3.3 Construção da biblioteca de SSH

Todo o processo de construção da biblioteca de SSH que envolveu desde a síntese da fita simples de cDNA (*sscDNA*), a partir das amostras de mRNA obtidas, até as hibridizações e amplificação das seqüências subtraídas de BAT 477, foi conduzida em duas fases distintas divididas em dias (etapas) diferentes de trabalho.

3.3.1 1ª Fase: Obtenção dos cDNA's

A partir dos mRNAs obtidos referentes aos dois genótipos 'com estresse' coletados no dia (16/02/2009), as fitas de cDNA foram sintetizadas utilizando-se o *kit SMARTer*TM *PCR cDNA Synthesis Kit*, de acordo com instruções contidas no manual do fabricante (*Clontech Laboratories, Inc.*).

3.3.1.1 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD PCR

Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados as concentrações de amostras de Carioca 80SH (CAR) e BAT 477 (BAT) descritas na Tabela 1 respectivamente. Seguindo orientações estritas do fabricante, ambas as amostras foram individualmente combinadas a 1 µl de 3' *SMART CDS Primer II A* e incubadas por 3 min a 72°C, seguidos de 2 min a 42°C. Imediatamente após, as amostras foram misturadas a um *Master Mix* contendo 2 µl de *5X First-Strand Buffer*, 0,25 µl de DDT (100 mM), 1 µl de *dNTP Mix* (10mM), 1 µl de *SMARTes II A Oligonucleotide* (12 µM), 0,25 µl de *Rnase Inhibitor* e 1 µl de *SMATScribe TM Reverse Transcriptase* (100 U) e incubadas por 1 hora a 42°C, seguidos de 10 min a 70°C.

Após a geração da fita simples de cDNA estas foram amplificadas por LD PCR (*Long-Distance PCR*) (segundo instruções de otimização de ciclos de amplificação recomendadas pelo fabricante) utilizando o *kit Advantage® 2 PCR Kit* (*Clontech Laboratories, Inc.*).

Tabela 1 - Quantidade total de mRNA de amostras de Carioca 80SH (CAR) e BAT 477 (BAT)

Identificação da amostra	ng/µl	260/280
BAT	35,09	2,13
CAR	27,38	2,03

Foram testados cinco ciclos de amplificação (15X, 18X, 21X, 24X e 27X) da seguinte maneira: Após o final dos primeiros 15 ciclos de amplificação para as duas amostras, foi removida uma alíquota de 30 µl de cada tubo de PCR, de um total de 100 µl; Destes 30 µl, foram removidos e armazenados 5 µl para análise posterior em gel de agarose 2%; Os 25 µl restantes retornaram para o termociclador para mais três ciclos adicionais, completando assim 18 ciclos; Destes 25 µl, foram removidos e armazenados 5 µl para análise posterior em gel de agarose 1.2%; Os 20 µl restantes retornaram para o termociclador para mais três ciclos adicionais, completando assim 21 ciclos; Destes 20 µl, foram removidos e armazenados 5 µl para análise posterior em gel de agarose 1.2%; Os 15 µl restantes retornaram para o termociclador para

mais três ciclos adicionais, completando assim 24 ciclos; Destes 15 µl, foram removidos e armazenados 5 µl para análise posterior em gel de agarose 1.2%; Os 10 µl restantes retornaram para o termociclador para mais três ciclos adicionais, completando assim 27 ciclos; Destes 10 µl, foram removidos e armazenados 5 µl para análise posterior em gel de agarose 1.2%; Cada uma das alíquotas foram então submetidas à eletreforese em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA, para a verificação da melhor qualidade de produto de amplificação.

3.3.1.2 Cromatografia de coluna

Após a obtenção das fitas duplas de cDNA (*dscDNA*) estas foram purificadas para a obtenção de fragmentos de tamanho adequado de *dscDNA* para a construção das bibliotecas utilizando a coluna de cromatografia do *kit* de purificação *CHROMA SPIN-1000* de acordo com as instruções presentes no manual do *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories, Inc.)*. Ao final do procedimento, uma alíquota de cada amostra foi separada para análise em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA.

3.3.1.3 Digestão das fitas de ‘*dscDNA*’

Após a obtenção do material devidamente purificado, ambas as amostras foram então digeridas com enzima de restrição *RsaI* para receberem os adaptadores necessários para o processo de construção da biblioteca subtrativa. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. Ao final do procedimento, uma alíquota de cada amostra foi separada para análise em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA.

3.3.2 2ª Fase: Construção da biblioteca subtrativa

Após ambas as amostras de *dscDNA* terem sido devidamente digeridas com *RsaI* todos os procedimentos posteriores, desde a purificação destes produtos digeridos, até as hibridizações e amplificação dos produtos subtraídos foram conduzidas de acordo com as especificações fornecidas no manual do *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Inc.)*.

3.3.2.1 Purificação da digestão e Ligação dos Adaptadores

Optou-se pelo procedimento de purificação contido no manual do *kit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit*, e não pelo oferecido no manual do *kit SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit*, exatamente devido ao fato de o primeiro oferecer ao final do procedimento as quantidades necessárias de produto digerido e purificado necessárias para a ligação dos adaptadores, dando assim andamento nas atividades utilizando o *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit*.

A purificação dos produtos de digestão foi conduzida através de uma lavagem inicial com 300 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguida de uma segunda lavagem com 300 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e uma terceira lavagem com mistura contendo 100 µl de NH₄OAc 4M e 750 µl de etanol 95%. O produto foi precipitado em etanol 80%. Ao final do procedimento, uma alíquota de cada amostra foi separada para análise em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA.

Neste ponto as amostras foram separadas em '*tester*', ou seja, a amostra de BAT477 que se deseja '*testar*', melhor dizendo, subtrair genes que sejam diferencialmente expressos; e a amostra denominada '*driver*', que no nosso caso são as amostras de Carioca 80SH, que conduzirão o experimento de subtração durante as duas etapas de hibridizações finais.

Todas as etapas seguintes de ligação dos adaptadores adaptadores 1 e 2R foram conduzidas somente na amostra *tester* (BAT 477). Para tanto as amostras foram divididas em duas alíquotas e cada uma delas submetida a uma reação de ligação a um dos adaptadores. Em novo tubo foram separados, antes da reação de ligação uma alíquota de 2 µl de cada reação (*tester 1-1* e *tester 1-2*) para ser o controle final não subtraído. As amostras (*tester 1-1* e *1-2*) foram então incubadas com adaptadores e DNA ligase em 16°C overnight para a realização da reação de ligação.

3.3.2.2 PCR da ligação

Após a ligação, foi utilizado 1 µl de cada umas das amostras (*tester 1-1* e *1-2*) para uma reação de PCR visando verificar se ao menos 25% dos cDNAs tinha adaptadores em ambas as extremidades. Para a reação foram utilizados: *PCR Primer 1* (disponível no *kit* e específico para os adaptadores), *Advantage cDNA Polymerase Mix* (*kit Advantage® 2 PCR Kit*) e, para substituir os primers *G3PDH* constitutivos de animais fornecido no *kit* usamos outro par de *primers* disponível em nosso laboratório e desenhado para feijoeiro (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos *primers* F e R utilizados

Classe funcional	Acesso NCBI	Primer Forward/Reverse 5'→3'	Tamanho do Unigene (pb)
Map kinase	CB543156.1	F: CGAGAGGATCAACACGGACATA R: CCTGCCCATGTAGAACTCCAA	439

Para nossas condições foram realizados 20 ciclos de amplificação e a qualidade dos produtos foi confirmada em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA.

3.3.2.3 Hibridizações

Nesta etapa, um excesso de cDNA da amostra *'driver'* (Carioca 80SH) foi adicionado em cada uma das amostras *'tester'* (*tester 1-1* e *1-2*). As amostras foram então desnaturadas e renaturadas para o anelamento. Após a primeira hibridização, as fitas simples de cDNA que não sofreram anelamento (disponíveis para a segunda hibridização) são enriquecidas pelas seqüências diferencialmente expressas já que cDNAs não alvo presentes nas amostras de *'tester'* e *'driver'* formaram híbridos.

1^a Hibridização: as reações foram montadas e conduzidas seguindo instruções presentes no manual do fabricante. Nesta etapa ambas as amostras *'tester'* (*tester 1-1* e *1-2*) são hibridizadas à amostra *'driver'* utilizando-se 1 µl de 4X Hybridization Buffer.

2^a Hibridização: as duas amostras oriundas da 1^a hibridização (*tester 1-1* e *1-2*) são misturadas e o cDNA da amostra *'driver'* desnaturado é novamente adicionado para um enriquecimento adicional das seqüências diferencialmente expressas. Ao final do procedimento novas moléculas híbridas foram obtidas consistindo de fitas duplas de cDNAs diferencialmente expressos com ambos os adaptadores em cada extremidade.

3.3.2.4 Amplificação das seqüências de cDNA diferencialmente expressas

Nesta etapa, os cDNAs diferencialmente expressos foram seletivamente amplificados em duas reações de PCR: uma, utilizando *PCR Primer 1*, para amplificação de moléculas contendo seqüências de diferentes adaptadores em cada extremidade e outra, utilizando *Nested PCR Primer 1* e *Nested PCR Primer 2R*, para enriquecimento das seqüências diferencialmente expressas. A qualidade dos produtos foi confirmada em gel de agarose 2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1 kb de DNA.

3.4 Sequenciamento

Uma alíquota do produto de PCR obtido após a construção da biblioteca de SSH, referente a transcritos diferencialmente expressos no genótipo tolerante submetido ao estresse, foi inserida no vetor *pGEM[®]- T Easy Vector* da fabricante Promega e clonada em *Escherichia coli* (linhagem *DH5 α*) para sequenciamento. O sequenciamento dos clones foi realizado em duas etapas visando a otimização de tempo: (1) Cinco placas e meia foram sequenciadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP (Piracicaba – SP), através do sistema *Dyemamics[®]*, usando o equipamento *ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems); (2) 12 placas foram sequenciadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp (CBMEG – Campinas – SP), através do sistema *BigDye v3.1*, em sequenciador *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (Applied Biosystems).

3.4.1 Preparação dos produtos de PCR subtraídos

Alíquotas de 7 μ l do produto de PCR subtraídos na biblioteca de SSH após a 2^o hibridização e amplificação com *primers nested*, foram aplicados em gel de agarose do tipo *Low-melting-point* 1,6% em 1x TSB buffer, junto com padrão de 1 kb de DNA.

Os fragmentos do gel foram separados em fragmentos menores que 1,5 kb (<1,5 kb) e fragmentos maiores que 1,5kb (>1,5 kb), excisados com auxílio de bisturi e purificados a partir do gel utilizando o kit de purificação *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, de acordo com especificações presentes no manual do fabricante.

Após a purificação, os produtos purificados (<1,5kb e >1,5kb) foram quantificados por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm utilizando *Nanodrop[®] ND 1000* de acordo com especificações para quantificação de ácidos nucleicos recomendadas pelo fabricante.

3.4.2 Protocolo para ligação usando *pGEM[®]- T Easy Vector*

As condições de reação adotadas para a ligação dos produtos de PCR da biblioteca, já purificados, ao vetor *pGEM[®]- T Easy* foram as seguintes: 5 µl de 2x *Rapid Ligation Buffer* (T4 DNA Ligase), 1 µl de *pGEM[®]- T Easy Vector* (50 ng), 3 µl de Produto de PCR, 1 µl de T4 DNA Ligase (3 unidades Weiss/µl) e água deionizada para completar o volume final (10 µl). A reação foi homogeneizada usando pipeta e incubada por 16 horas a 4°C.

3.4.3 Sequenciamento pelo método *Dyynamics[®]*

3.4.3.1 Transformação bacteriana de células termocompetentes

Após a reação de ligação foram adicionados a 100 µl de suspensão de células termocompetentes de *E. coli*, linhagem *DH5α*, 4 µl da reação de ligação e estes foram misturados gentilmente com micropipeta; Em seguida as amostras (<1,5kb e >1,5kb) foram incubadas por 30 min em gelo, incubadas por 50 seg a 42°C e imediatamente retornadas ao gelo por 2 min; Em câmara de fluxo, às células transformadas foram adicionados 400 µl de meio Luria Bertani (LB) líquido e estas foram incubadas a 37°C sob agitação (~200rpm) por 2 horas; Os 500 µl foram então centrifugados gentilmente. Descartou-se 200 µl da solução sobrenadante; O restante da solução foi então plaqueado em 40ml de meio Luria Bertani (LB) sólido contendo 1 µl/ml de IPTG, 1 µl/ml de XGal e 1 µl/ml de ampicilina; As placas foram mantidas em incubadora por 18 horas a 37°C para o crescimento das colônias; Após o crescimento das colônias, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados, as colônias de coloração branca foram picadas e o palito 'mergulhado' em cavidades de placa de PCR contendo 50 µl de TE buffer (1X) (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0,1 mM EDTA); Em termociclador, a placa contendo as suspensões celulares foram aquecidas a 95°C por 10 min para provocar a lise celular das bactérias e expor os vetores contendo os insertos dos clones.

3.4.3.2 Amplificação dos insertos dos clones com *primer M13*

Após a extração dos vetores contendo os insertos à partir dos clones em TE, foi feita a reação de amplificação destes insertos com o par de primers M13 de acordo com a seguinte reação padrão: 21,05 µl de Água MilliQ, 3 µl de *PCR Buffer* (10X), 1,8 µl de MgCl₂ (50mM), 0,6 µl de dNTP's (2,5 mM de cada), 1,2 µl de *Primer Forward* (M13F) (5pmol), 1,2 µl de *Primer Reverse* (M13R) (5pmol), 0,15 µl de *Taq Polymerase* (50U/1 µl), 1 µl de DNA. As condições de reação foram as seguintes: 5 min de denaturação inicial a 95°C; 30 ciclos de: 30 seg de desnaturação a 95°C, 30 seg de anelamento a 52 °C, 1 min de extensão a 72°C; 10 min de extensão final a 72°C. Depois da reação, foi feito um gel de agarose 1,7% com TSB 1X e carregado com padrão de DNA 1kb para verificar a qualidade da amplificação dos insertos.

3.4.3.3 Purificação dos produtos de PCR em Placas 96-well

Em cada uma das 96 cavidades da placa de PCR foram adicionados 104 µl de isopropanol 75% e incubado overnight a 4°C; Após isso, a placa foi centrifugada por 90 min a 4000 rpm, com desaceleração da parada ajustada de 30 em 30 rpm; O sobrenadante foi descartado na invertendo-se a placa gentilmente e posteriormente centrifugado (pulso) invertido com papel absorvente, com rotação de até 500 rpm; Foram então adicionados 150 µl de etanol 70% e a placa centrifugada por mais 90 min; O sobrenadante foi novamente descartado, e centrifugado (pulso) invertido com papel absorvente, com rotação de até 500 rpm; As amostras foram então secas em termociclador por 10 min a 40°C, cobertas com papel absorvente e sem fechar a tampa; Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 12,5 µl de Água MilliQ; Foi carregado um gel de agarose 1,7% com TSB 1X e carregado com padrão de DNA 1kb para verificar a purificação dos insertos.

3.4.3.4 Reação de sequenciamento

A reação padrão de sequenciamento empregada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP foi a seguinte: 2 µl de Buffer 2,5X, 2 µl de Dyenamics, 1 µl de Primer M13F (5pmol), 1 µl de DNA e 4 µl de Água MilliQ (volume final de 10 µl). As condições de reação foram as seguintes: 30 ciclos de: 20 seg de desnaturação a 95°C, 15 seg de anelamento a 50°C, 1 min de extensão a 60°C.

3.4.3.5 Precipitação dos fragmentos de DNA (*kit Dyenamics*)

Foram adicionados em cada uma das 96 cavidades da placa de PCR, 2 µl de Tampão Acetato de Sódio 1,5M/ EDTA 0,25M. Em seguida a placa foi agitada vigorosamente por 15 seg, adicionado mais 60 µl de Etanol 100% e agitada vigorosamente novamente por 15 seg; A placa foi centrifugada a 4000 rpm, por 45 min, em temperatura ambiente; O sobrenadante foi descartado invertendo-se a placa gentilmente e posteriormente centrifugado (pulso) invertido com papel absorvente, com rotação de até 900 rpm; O precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70% e centrifugado a 4000 rpm, por 15 min; O sobrenadante foi totalmente descartado com micropipeta, os precipitados foram secos em termocicador por 20 min à 45°C e ressuspensos em 10 µl de *Hi-Di Formamide*, agitada em vortex e dado um pulso em centrifuga.

3.4.4 Sequenciamento pelo sistema *BigDye v3.1*

3.4.4.1 Transformação bacteriana de bactérias quimiocompetentes (Método PEG)

Após a mesma reação de ligação descrita anteriormente as células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem *DH5α*, foram descongeladas em gelo; O produto da ligação foi misturado (cerca de 10 µl) com 70µl de *Transfo buffer* (1mL de

10X KCM – 1M KCl, 0,3M CaCl₂, 0,5M MgCl₂ -, 1,5 mL PEG 10% - w/v, 6000 ou 4000 -, 7,5 mL H₂O). A mistura foi mantida em gelo; Foram adicionadas 100µl de células competentes e mantida a mistura em gelo por 30 min; Após o passo anterior a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 min; Logo em seguida foi adicionado 1 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido e incubada a mistura a 37°C por 50min sob agitação de 250 rpm; Após a transformação, 250 µl foram plaqueados em 40 ml de meio LB sólido contendo 1 µl/ml de IPTG, 1 µl/ml de XGal e 1 µl/ml de ampicilina; As placas foram mantidas em incubadora por 18 horas a 37°C para o crescimento das colônias; Após o crescimento das colônias de bactérias, com o auxílio de palitos de madeira autoclavados, as colônias de coloração branca foram picadas e o palito 'mergulhado' em cavidades de placas de 96 amostras (para PREP) contendo 1 mL de meio Circle Grow (CG) com ampicilina e seladas com adesivo que posteriormente foram furados sobre cada cavidade com agulha esterelizada; As placas foram levadas agitador por 18-20 h de incubação a 250 rpm.

3.4.4.2 Preparação do DNA plasmidial em placas de 96-well

No dia anterior a PREP:

As 12 placas de cultura foram retiradas do agitador após 18 horas de incubação; As placas foram centrifugadas a 4000rpm durante 6 min a temperatura ambiente; O sobrenadante foi descartado e o excesso enxugado invertendo-se a placa sobre folhas de papel absorvente limpo; Foram então adicionados 240 µl de GTE, seladas as placas com adesivo e vortexadas até a ressuspensão dos *precipitados* por aproximadamente 20 s; Posteriormente as placas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 6 min; A solução sobrenadante foi descartada, o excesso foi enxugado invertendo-se as placas sobre papel absorvente limpo, seladas com adesivo e congeladas em -20°C para posterior preparo das reações.

Foram adicionados 80 µl de GTE por amostra em cada placa. Estas foram seladas e vortexadas até a ressuspensão do precipitado (*precipitados*). Enquanto isso, foram preparadas placas PP (polipropileno) de fundo V (*Greiner*) contendo 2,5

µl de RNase (100 µg/µl) em cada cavidade; 60 µl do homogeneizado foi então transferido para as placas contendo a RNase; Foram adicionados em cada amostra 60 µl de NaOH/SDS com cuidado para não haver transbordamento da mistura e conseqüente contaminação e seladas com adesivos. As placas foram misturadas por inversão durante 30 s e deixadas em repouso por 8 min; Antes de remover os adesivos, foi dado um pulso em centrífuga até 3000 rpm para evitar contaminação durante a remoção dos mesmos; Foram adicionados então 60 µl de KOAc 3M (4°C) por amostra. As placas foram seladas com adesivos e misturadas por inversão durante 30 s. Foi dado um pulso em centrífuga até 3000 rpm para evitar contaminação durante a remoção dos adesivos; Novo adesivo foi então colado às placas e estas foram incubadas a 90°C durante 30 min. Sendo logo em seguida centrifugadas a 4000 rpm, durante 10 min a 4°C; Foram transferidos 130 µl do sobrenadante de cada amostra para placas de fundo U, adicionados 100 µl de isopropanol e seladas as placas. Estas foram então vortexadas durante 30 s e incubadas mais 5 min a temperatura ambiente; Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 45 min a 4°C; Foi adicionado 200 µl de etanol 70% gelado (-20°C), as placas foram seladas e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min; O sobrenadante foi descartado e o excesso enxugado invertendo-se as placas sobre papel absorvente limpo; Foi adicionado 80 µl de H₂O Milli-Q a cada amostra, as placas foram seladas e deixadas ressuspendendo *overnight* a temperatura ambiente.

3.4.4.3 Protocolo de sequenciamento

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Para cada placa foi utilizado um mix feito com 1300 µL de água Milli Q; 400 µL de 5X tampão *Save Money* (300 µL Tris-HCl 1M pH 9.0; 7,5 µL MgCl₂ 1M e 1200 µL de água Milli Q); 100 µL de primer M13 F; 100 µL de *BigDye v3.1*. Deste pré-mix, 19 µL foram dispensados em cada cavidade, e a este foi adicionado 1 µL de DNA. O ciclo de PCR usado foi: 96°C por 1,5 min, seguidos de 25 ciclos de 96°C por 12 s; 50°C por 6 s e 60°C por 4 min. A precipitação foi feita

pela adição de 80 μ L de etanol 80%. Logo após, as placas foram seladas e invertidas manualmente por 30 s e deixadas de repouso por 15 min. Após esse período, centrifugaram-se as placas por 45 min a 4000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e mais 150 μ L de etanol 70% foram adicionados. Logo em seguida, outra centrifugação foi feita com os mesmos parâmetros por apenas 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as placas foram deixadas à temperatura ambiente até secar. Antes de ir para o seqüenciador, as placas foram ressuspensas em 10 μ L de formamida e deixadas em repouso por 10 min. Em seguida, as placas foram desnaturadas na PCR (96°C por 10 min).

3.5 Análise das sequências: ferramentas de Bioinformática empregadas

Um *site* foi criado no Servidor *PowerEdge 2900* da Dell para montagem do banco de dados e análises de bioinformática deste projeto. Os dados de sequenciamento foram gerados no seqüenciador e enviados por FTP ao servidor para processamento dos cromatogramas via um *pipeline* (uma série de programas que irão converter os arquivos **.ab1* em arquivos **.fasta*, essenciais para o manuseio das sequências).

Um programa detecta a recepção de arquivos contendo os cromatogramas e faz o tratamento inicial de seleção das sequências através das ferramentas *Phred* e *Phrap*, que identificam e atribuem qualidade às bases. A ferramenta *Phred* (www.phrap.org) atribui valores aos cromatogramas, e o programa *ph2fasta* (www.phrap.org) converte as ESTs com valor *phred* ≥ 20 em sequências de nucleotídeos no formato **.fasta*.

Após esta etapa, fez-se um processo de trimagem dos dados onde foram removidas todas as sequências poli-A/T e regiões de sequências de baixa qualidade (TELLES; SILVA, 2001). Este processo foi feito utilizando-se o programa *blastall* (www.ncbi.nlm.nih.gov) que implementa o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), o programa *crossmatch* (www.phrap.org), o SWAT (www.phrap.org) e programas do

tipo *ad hoc pattern-matching* escritos em *Pearl* (www.cpan.org). Para a interpretação dos dados foram usados programas *Parsers* construídos em linguagem *Pearl*. O processo de trimagem é resumido pela Figura 4.

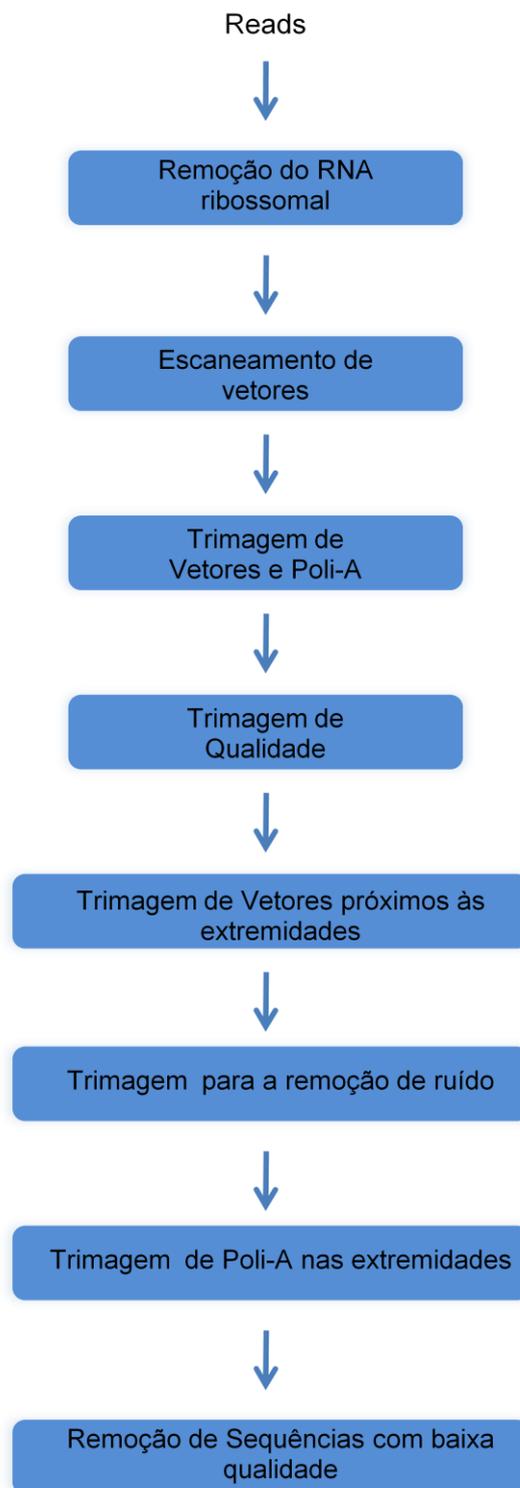


Figura 4 - Visão geral do processo de trimagem. Fonte: adaptado de Telles e Silva (2001)

A retirada dos vetores também foi feita durante a trimagem pelo programa *Crossmatch* (www.phrap.org). Este programa substitui bases com um 'X' se estas forem similares a sequências de vetores e adaptadores usados em bibliotecas de clones. Este processo foi então sucedido pela deleção das regiões marcadas com um 'X'.

Após a trimagem dos dados, o *pipeline* estabelecido providenciou o agrupamento dos *reads* cujas sequências eram similares em *clusters*. Esta ação é importante para evitar excessos de redundâncias através da oferta do valor da novidade da biblioteca que está sendo sequenciada, ou seja, permite que o pesquisador saiba quando devem parar de sequenciar novas amostras, pois novos resultados já não são mais alcançados (TELLES; SILVA, 2001). Programas utilizados para agrupar fragmentos foram usados na formação dos *clusters*; estes programas reúnem *reads* e seus dados de qualidade, constroem grupos baseados na sobreposição destes *reads* e criam sequência consenso representativa dos membros de cada grupo.

Os *reads* oriundos da trimagem foram agrupados pelo programa *phrap* (www.phrap.org) com os argumentos fixados em valores predeterminados (*penalty -15, bandwidth 14, minscore 100, shatter_greedy*). A montagem final dos *contigs* foi feita pelo programa *CAP3* (HUANG; MADAN, 1999) eliminando as redundâncias e produzindo sequências mais longas e de maior qualidade, através do agrupamento de ESTs com similaridade entre sequência. O rendimento das bibliotecas foi considerado ideal quando mais que 75% das sequências possuem no mínimo 350 nucleotídeos com "Phred Quality" ≥ 20 .

Depois disso, tendo como objetivo inferir funções putativas (possíveis funções) às ESTs obtidas, adotando-se como base neste caso similaridades com sequências cujas funções já foram descritas em outras espécies, as sequências foram comparadas a de outros organismos, disponíveis em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O software *BLASTX* foi utilizado para esta comparação (ALTSCHUL et al., 1997). Os bancos são atualizados mensalmente de forma automática, sendo todos os resultados de BLAST atualizados também.

Como as seqüências geradas pela biblioteca subtrativa foram digeridas antes da clonagem, diferentes *clusters* ou *singlets* representaram, mesmo após a clusterização, um mesmo gene. Essa redundância foi posteriormente removida através do resultado dos *BLASTs* gerados, e genes com resultados com mesmo *GI* (*gene id*) foram tratados como um único gene.

3.6 Anotação das seqüências

Depois de concluída a busca por similaridade no banco de dados não redundante do NCBI (www.ncbi.com) através da ferramenta BLASTX, seqüências redundantes com valor E-Value menor ou igual a e^{-5} foram anotadas e os resultados das buscas encontram-se atualmente disponíveis no *site* (Figura 5). Para a anotação das seqüências, ou seja, para se inferir uma função putativa para cada EST foi considerado além do E-Value, a seqüência do banco de dados do NCBI com a qual foi gerado maior alinhamento significativo (*'best Hit'*) medido através do *Score* e também utilizando-se critérios pessoais baseados em literatura.

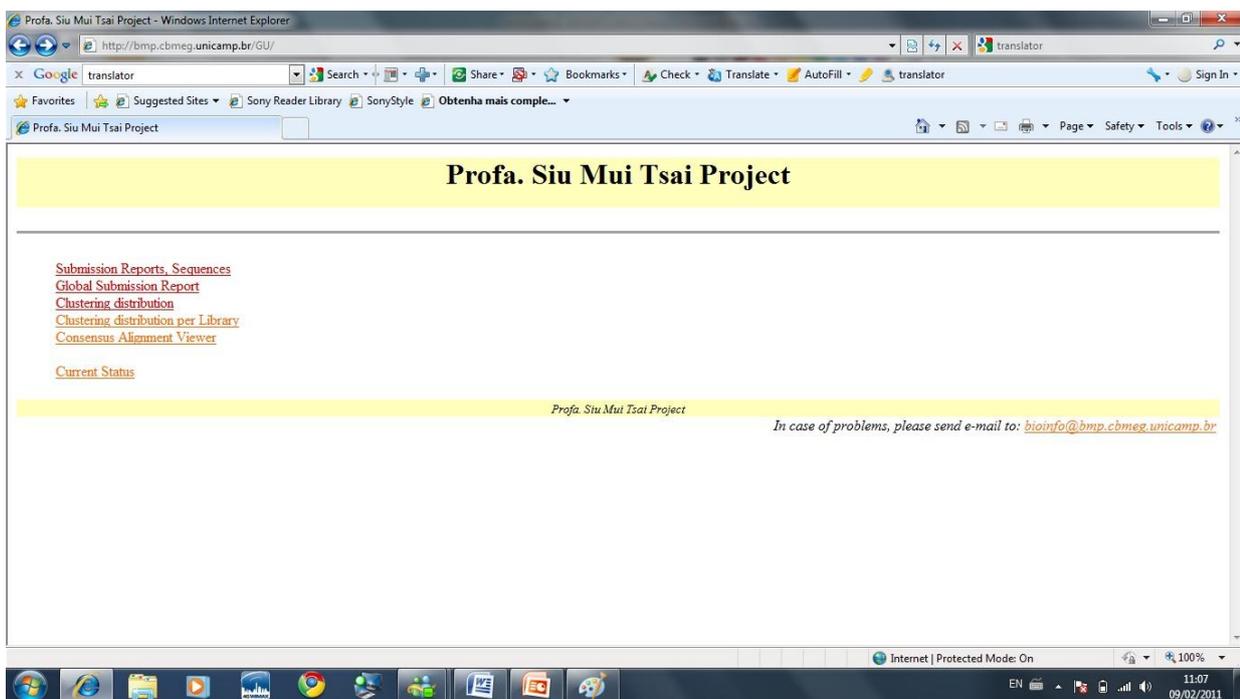


Figura 5 - Site contendo as seqüências da Biblioteca Subtrativa de cDNA

A anotação das ESTs nos rendeu uma lista (dado não disponível) contendo o código de identificação da EST no banco de dados, o GI e a descrição da sequência do banco de dados do NCBI usada para inferir função, *Score* e *E-Value*. Após esta etapa, esta lista foi manualmente processada, sendo as sequências estudadas uma a uma para anotação em classes funcionais. Diversas ferramentas de anotação tais como *Blast2GO* (www.blast2go.org/) e *GOSlim Viewer* (http://agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer_select.pl) foram testadas, mas nenhuma delas foram implementadas em nossa análise, sendo que uma maior discussão sobre este fato pode ser encontrada no item Resultados e Discussões.

Foi utilizado para a anotação funcional dos genes um sistema por nós compilado que reúne características do sistema manual e interpretativo CS (*Combination Scheme*) de Rison, Hodgman e Thorton (2000) (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~rison/FuncSchemes/>) e o sistema adaptado para plantas do *MIPS Functional Catalogue Database* (http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html). Uma cópia deste sistema por nós adaptado encontra-se no Anexo 2. As sequências foram posteriormente classificadas em cada classe funcional.

3.7 Validação da biblioteca subtrativa através de quantificação relativa via RT-qPCR

3.7.1 Seleção dos genes para análise de expressão relativa em RT-qPCR e otimização dos *primers*

Para o desenho dos *primers* que seriam necessários para o experimento de validação através de RT-qPCR, foram selecionados genes presentes na lista de *contigs*, ou seja, aqueles que provavelmente estariam sendo expressos em maior abundância pelo genótipo BAT 477, exatamente por sua frequência de ocorrência (número de cópias formando *clusters*) ser maior na biblioteca.

Os *primers* foram desenhados seguindo-se os seguintes passos:

- A sequência consenso em formato *fasta* de cada EST foi inicialmente submetida à busca por similaridade com sequências de *P. vulgaris* (ou de espécies relacionadas) já depositadas em bancos de dados públicos (NCBI) utilizando a ferramenta *Blastn*. Desta forma era escolhida a sequência (do nosso banco de dados, ou a do NCBI) que estivesse mais completa.

- Tal julgamento era feito através do programa *ORF finder* (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/) selecionando-se a sequência que apresentasse o maior e melhor ORF (quadro aberto de leitura) e a presença de domínios conservados para o gene.

- Após a determinação da ORF, sua sequência em formato *fasta* era submetida ao programa *Primer3 input* (versão 0.4.0, www.frodo.wi.mit.edu/) para o desenho automático dos *primers* seguindo os seguintes critérios: 1) *Product Size Range*: 150-200 bp; *Primer Size*: min18, opt.20, Max.22; *Primer Tm*: min.57, opt.60, Max.63; %GC: 40-60%.

- Para cada gene, foram selecionados os cinco melhores pares de *primers* que a partir de então foram testados pelo programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html) para a verificação da possível formação de estruturas secundárias como grampos, dímeros, cross-dímeros, palíndromos e ligações na região 3', já que este fato pode gerar ruídos e inespecificidade, além de produtos inespecíficos que prejudicariam a qualidade da análise de PCR em tempo real.

- Para cada um dos genes foram selecionados aqueles que apresentavam temperaturas de anelamento mais estáveis e não tinham a formação de estruturas secundárias. A Tabela 3 apresenta as especificações dos *primers* por nós sintetizados.

Tabela 3: Especificações dos *primers* sintetizados para as análises de RT-qPCR, contendo a descrição dos genes selecionados na biblioteca (dentre a lista de *contigs*), tamanho dos *primers* em *bp*, temperatura de anelamento, porcentagem do conteúdo de GC e tamanho do *amplicon* oferecido pela reação de PCR

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	<i>Tamanho (bp)</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>GC%</i>	<i>Tamanho Amplicon (bp)</i>
GHRPv 1	dissimilatory sulfite reductase beta subunit	F: CGTTCTGTTGACGATTTCA R: TTTCGCACATTTTGTCCAGA	59,84 60,23	45 50	170
GHRPv 2	desiccation protective protein LEA5	F: CTGTTTCATCGGCGAGGTTAT R: TCATGGGCCTGTAGTCACCT	60,1 60,53	50 55	183
GHRPv 3	Pathogenesis-related protein 2	F: TTCGAGGACCAAACCACTTC R: CTTTGTCTCCCCATCCTCAA	60,09 60,04	50 50	180
GHRPv 4	histone h2a	F: ATGCTGCTCGTGACAACAAG R: TCTTGGGCAACAGAATAGGG	60,06 60,07	50 50	153
GHRPv 5	Methionine adenosyltransferase	F: TTACCTCGGAGTCCGTGAAC R: TCCCACATCGTTTGAGATGA	60,11 60,05	55 45	236
GHRPv 6	NAC domain protein	F: TGAAACCCCTGCGTAAAATC R: TTCGGGGAATAATCAAGTGG	59,94 59,76	45 45	201
GHRPv 7	Sina	F: TGTGATTTTGTTCCTCGTC R: GCGGACTTTATGTCCCAGAG	59,7 59,69	45 55	201
GHRPv 8	EF-hand, calcium binding motif S-	F: ATGGGAAAATCAGTGCCAAG R: GCCACTCATCATCCTCA	59,93 59,99	45 50	155
GHRPv 9	adenosylmethionine decarboxylase	F: TGAGCCTGCCATCTTGACTA R: ATCCGCAAGCCATCCTGA	59,55 62,75	50 55,56	150
GHRPv 10	proline-rich protein	F: GCAGGTACTTTGGGTGTGGT R: ATGAGAAGCCCCCTGTTT	59,89 57,06	55 50	168
GHRPv 11	isoflavone synthase 1	F: GGTTCCAAACCTCTGCCATA R: TGAGGAACTTGCGGATCTCT	59,93 59,95	50 50	171
GHRPv 12	N3 Protein	F: CACCATGAACTTGGGCTTT R: GGCTAGCATCCTTCTTGACG	59,97 59,98	45 55	199
GHRPv 13	late embryogenesis abundant protein	F: AGGAGGTGGACACCATCAAC R: GCAAAGCCCCTCTTTCTTTC	59,82 60,32	55 50	186
GHRPv 14	Ubiquitin	F: CGCAAGTGGTACGCTTGTT R: CCTGACCTGCACATGCTAAA	59,92 59,86	52,63 50	217
GHRPv 15	cation:cation antiporter	F: CAAACGAGCTTGTGGCTCTA R: TGAACCCCATCTTCTCCATC	59,22 59,86	50 50	151
GHRPv 16	Gamma carbonic anhydrase-like	F: GCAATCCTGCAAAGTTCCCTC R: CGAACAAACCCAGCATAGA	59,82 59,72	50 50	202
GHRPv 17	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	F: ACGAGGAACACCACTTCGAG R: AGTGACACTTTGCGTGTCCA	60,3 60,36	55 50	170
GHRPv 18	glutaredoxin-1	F: TCCTCTGCCCTGTTATTGT R: CCACCAATGTGCTTTCCTCT	59,55 60,11	50 50	206
GHRPv 19	malate dehydrogenase-like protein	F: CCAAAGACCCAGTTCGTGTT R: TTCCATTTTAACCCCGTTCA	60,01 60,17	45 45	241

Para os testes dos *primers* foi preparada uma reação comum de PCR utilizando alíquota de cDNA que havia sobrado após a purificação das fitas de *dscDNA* durante a confecção da biblioteca subtrativa. A reação foi a seguinte: 2,5 µl de *PCR Buffer* (10X); 1,5 µl de $MgCl_2$ (50mM), 0,5 µl de dNTP's (2,5 mM de cada); 2 µl de *Primer Forward* (5pmol); 2 µl de *Primer Reverse* (5pmol), 1 µl de cDNA (20ng/µl); 0,2 µl *Taq Polymerase* (50U/1 µl) e 15,3 µl de água DEPC 0,1%. As condições de amplificação foram as seguintes: 10 min de desnaturação inicial a 94°C; 40 ciclos de: 30 seg de desnaturação a 94°C, 30 s de anelamento a 55 °C, 1 min de extensão a 72°C; 7 min de extensão final a 72°C. Após a reação a qualidade dos produtos de amplificação (presença de produtos de inespecíficos) foi verificada em gel de agarose 1,5% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 100 pb de DNA.

3.7.2 Preparo das amostras para análise de expressão relativa em RT-qPCR

A extração do RNA total das amostras relacionadas aos tratamentos BAT 477 sob estresse e controle, Carioca 80 SH sob estresse e respectivo controle, todas coletadas no dia 16/02/2009, foi realizada mediante o uso de reagente Trizol (*Trizol[®]LS Reagent*) seguindo as orientações do catálogo N° 15596-018 da fabricante Invitrogen e as mesmas modificações feitas por nós já mencionadas anteriormente. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm utilizando *Nanodrop[®] ND 1000* de acordo com especificações para quantificação de ácidos nucleicos recomendadas pelo fabricante e posteriormente a qualidade do material foi analisada em gel de agarose 1,6%.

Após a extração de RNA total de cada amostra, estas foram tratadas com DNase seguindo a seguinte reação: 1 µL de RNA (1µg/ µL); 1 µL de 10X *Buffer*; 1 µL de DNase; H_2O DEPC 0,1% necessária para 10 µL de reação. A mistura foi incubada a 37°C por 30 min, sendo adicionado logo em seguida 1 µL de EDTA para interromper a reação e incubada novamente a 65°C por 10min. Posteriormente, as amostras foram quantificadas e diluídas com H_2O DEPC 0,1% necessária para atingir a concentração final de RNA de 100ng/µL.

Foram testados dois *kits* para reações de RT-qPCR a fim de determinar qual deles seria o mais adequado para o uso em nosso experimento frente à natureza de nossas amostras. Os *kits* testados foram: *SensiMix™ SYBR One-Step Kit* e o *Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for two step RT-QPCR*. Ambos os *kits*, diferem um do outro pelo número de passos empregados na reação, ou seja, no primeiro caso, RNA total é adicionado diretamente à reação, enquanto no segundo, inicialmente RNA total é convertido em cDNA e posteriormente este cDNA é empregado na reação.

3.7.3 Protocolo para reação de RT-qPCR empregando *SensiMix™ SYBR One-Step Kit*

A reação utilizada foi a seguinte: 5µL de 2X *Sybr on Step*; 1 µL de *Primer Forward* (2,5pmol); 1 µL de *Primer Reverse* (2,5pmol); 0,4 µL de Inibidor de Rnase; 1 µL de RNA (100ng/µL); 1,6 µL de H₂O Deionizada. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial em duas etapas sendo a primeira 10 min a 42°C e a segunda 10 min a 95°C; 40 ciclos de: 15 s de desnaturação a 95°C, 20 s de anelamento a 60°C, 20 s de extensão a 72°C (contendo coleta de dados); A curva de *Melting* dividida em três etapas sendo a desnaturação de 95°C por 15 s, anelamento de 60°C por 1min e extensão de 95°C por 15 s com coleta de dados entre anelamento e extensão a cada aumento de 0,7°C de temperatura.

3.7.4 Protocolo para reação de RT-qPCR empregando *Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit*

Como mencionado, esta reação requer dois passos, sendo o primeiro para a síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total feita em termociclador normal e na segunda etapa acontece a reação de RT-qPCR propriamente dita:

1ª Etapa - Na primeira etapa a reação empregada foi a seguinte: 2 µL de 5X *Reaction Mix*; 1 µL de *Max Enzyme*; 1 µL de RNA (100ng/µL) e 5 µL de H₂O deionizada. Incubadas a 25°C por 10min, 50°C por 15 min e 85°C por 5min.

2ªEtapa – Na segunda etapa a reação foi a seguinte: 5 µL de *Sybr Green 2X*; 1 µL de *Primer Forward* (2,5pmol); 1 µL de *Primer Reverse* (2,5pmol); 1 µL de cDNA (100 ng/µL); 2 µL de H₂O Deionizada. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 10 min a 95°C; 40 ciclos de: 15 s de desnaturação a 95°C, 20 s de anelamento a 60°C, 20 s de extensão a 72°C (com coleta de dados); A curva de *Melting* divide em três etapas sendo a desnaturação de 95°C por 15 s, anelamento de 60°C por 1min e extensão de 95°C por 15 s com coleta de dados entre anelamento e extensão a cada aumento de 0,7°C de temperatura.

3.7.5 Análise de expressão relativa em RT-qPCR

As análises de expressão relativa em RT-QPCR foram conduzidas em equipamento *StepOnePlus™ RealTime PCR Systems* (Applied Biosystems) e foram divididas em quatro etapas, ou seja, quatro placas de experimentos foram montadas no sentido de alocar em cada uma não somente as amostras dos quatro tratamentos, cuja expressão do gene em questão seria analisada, mas também para que cada unidade amostra(tratamento) + gene pudesse ter repetições biológicas, que aqui foram feitas na forma de triplicatas. Também foram alocadas em cada placa as triplicatas das amostras de cada tratamento submetidas aos dois genes de referência, *act* e *skip2*, além do branco para cada mistura de reação.

Os resultados das análises de RT-qPCR foram monitorados e registrados a cada ciclo de amplificação pelo programa *StepOne™ Software v2.0*. Após o final de cada experimento, foram analisadas as curvas de amplificação de cada triplicada + gene para verificar se estas possuíam falhas de amplificação ou diferenças marcantes de valor de Ct que pudessem levar a posteriores dificuldades nas análises estatísticas dos dados e também foram verificadas as curvas de *melting* para cada conjunto triplicada + gene, esta análise sendo um recurso importante para

se verificar se houve, dentro da triplicada, amplificação uniforme do gene em questão.

3.7.6 Análise estatística do experimento de expressão relativa em RT-qPCR

De posse dos dados de amplificação de todas as placas, os dados foram então exportados para planilhas de Excel para serem analisados pelo *software* de construção de regressão linear *LinRegPCR (12.x)*, um programa destinado a análise de dados de RT-qPCR baseados no sistema *SYBR Green*. Basicamente, este programa faz uma correção do *baseline* (linha de base, onde o produto que está sendo gerado ainda não é suficiente para se sobrepôr ao ruído do equipamento) para cada unidade amostra+gene separadamente e determina a janela de linearidade, onde são destacados de quatro a seis pontos onde houve coleta de dados (de fluorescência) na fase exponencial da curva de cada amostra e que possuem entre eles máxima correlação possível ($R \geq 0,996$). Desta forma o programa consegue gerar dados de regressão linear para cada amostra fixando uma linha reta ao longo do conjunto de dados de PCR obtidos. Será a partir das inclinações destas retas que serão obtidos os valores de eficiência (E) para cada amostra que é a melhor forma de se analisar dados de quantificação relativa de genes. Esta ferramenta também é importante para definir de forma mais precisa valores de Ct.

Com os dados de E e Ct foi possível realizar todos os cálculos necessários para se chegar ao valor de N_0 , ou seja, a concentração inicial de cada um dos *amplicons* (cópias do gene) em cada amostra. Baseado nesses valores foi possível obter um valor médio de N_0 para cada uma das triplicatas e assim normalizar os resultados com base no valor de N_0 dos genes de referência de cada placa correspondente à placa em que o gene foi analisado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal e indução dos genes de resistência à seca

Os dados referentes ao monitoramento no conteúdo de água do substrato dos vasos, umidade do substrato (Umidade %), bem como os valores de 'peso umido' (Pu), 'peso seco' (Ps), e 'peso seco real' de cada amostra (Psr), encontram-se presentes nas Tabelas A, B, C e D do Anexo 1. As coletas de material vegetal para a construção dos *bulks* de tecidos foram iniciadas 24 horas após as amostras de substrato dos vasos contendo plantas do genótipo BAT 477 atingirem como mencionado anteriormente U% médio = 25,06 e Carioca = 25,92. Segundo Garcia e André (2002), para o feijoeiro a primeira resposta à presença do estresse hídrico é a murcha das folhas (Figura 6). Como foi possível observar, este sintoma esteve presente por praticamente todo o período em que a planta esteve submetida ao estresse.



Figura 6 - Alteração do ângulo foliar em folhas de *P. vulgaris* L. devido à murcha

Em estudos de campo onde foram utilizados padrões de medida similares para cálculo da umidade do solo (Umidade %) conduzidos por Procópio et al (2004), o PMP, a partir do qual a re-hidratação não surtiu mais efeito para resgatar o vigor da planta, foi detectado para valores de U% médio = 16,65%. Em nossos estudos,

porém as plantas (tanto as cultivares resistentes, quanto as suscetíveis) apresentaram todos os sintomas típicos relacionados ao PMP, porém não chegaram a atingir este estado.

Como podemos observar na Tabela A.3 do Anexo 1, ao terceiro dia de coletas (após 6 dias sem irrigação), os valores de U% médio eram iguais a 8,8% para BAT 477 e 9,07% para Carioca 80SH, ou seja, valores bem abaixo aos detectados por Procópio et al. (2004), no entanto, pudemos estender as condições de experimentação por mais dois dias quando foram realizadas as últimas coletas, sendo os valores de U médio máximo que conseguimos alcançar em nosso experimento, em casa de vegetação, de 6,41% para BAT 477 e 6,54% para Carioca 80SH.

No momento da última coleta (dia 18/02/2009 – Tabela A.4, Anexo 1), as plantas de ambos os genótipos apresentavam sinais de já terem atingido plenamente seu PMP. Baseado nisso, optamos por reidratá-las a fim de definir o exato PMP para nossos genótipos. As plantas ‘com estresse’ receberam a mesma quantidade de água que as plantas ‘sem estresse’, ou seja, 300 ml de água por vaso por dia, e 24 horas após suas folhas apresentaram os primeiros sinais de recuperação do turgor. Segundo Garcia e André (2002), tal capacidade de recuperação é comum para a espécie *P. vulgaris*, tendo sido também evidenciada por outros autores, portanto optamos por refazer o experimento para detectar a U% média do solo exata em que nossas cultivares atingiram o PMP. Para este experimento, realizado também em casa de vegetação e sob as mesmas condições do primeiro, foi evidenciado que para ambas as cultivares, o PMP gira em torno de U% médio = 3%.

4.2 Extração e Purificação de RNA total

A extração do RNA total dos *bulks* de raízes referentes à coleta do dia 16/02/2009 foi realizada com sucesso utilizando o reagente Trizol (Trizol®LS Reagent) o qual permitiu a obtenção de amostras de RNA total com boa quantidade e qualidade. Quanto ao *kit* de purificação utilizado, o *Dynabeads® mRNA*

Purification Kit, nenhuma alteração de protocolo foi necessária, já que seguindo as instruções do fabricante conseguimos obter também quantidades satisfatórias de mRNA.

4.2.1 Extração e Purificação de RNA total: BAT 477

No total foram realizadas 27 extrações de RNA total de raiz para BAT 477 submetido ao estresse. Os resultados de quantificação e de qualidade das amostras, obtidos por espectrofotometria utilizando *Nanodrop® ND 1000*, encontram-se dispostos na Tabela 4. A Figura 7 mostra um dos géis de agarose 1,6% carregados com amostras de BAT 477 para a verificação da qualidade das amostras extraídas.

Tabela 4 - Quantificação das amostras de BAT 477 obtidas por espectrofotometria

Identificação da amostra	ng/μl	260/280
1	1187,55	1,94
2	419,12	1,94
3	264,94	2,02
4	114,9	1,96
5	262,82	2
6	127,33	2
7	743,27	2,01
8	1258,36	2
9	959,44	1,99
10	1178,49	1,97
11	811,39	2
12	1177,15	1,93
13	1220,96	1,99
14	662,86	2,01
15	1450,26	1,99
16	1346,33	1,98
17	1020,57	1,99
18	847,54	2,02
19	1469,71	1,98
20	597,32	1,94
21	440,45	1,98
22	456,17	1,94
23	979,88	1,95
24	580,51	2
25	995,83	2,02
26	1048,79	2
27	741,59	1,99

Em geral, as extrações de RNA total de BAT 477 apresentaram um excelente rendimento (Tabela 4). A quantidade mínima extraída foi 127,3 ng/μl e a máxima foi

de 1469,7 ng/ μ l, com a média geral girando em torno de 800 ng/ μ l a cada extração. Isso pode estar relacionado ao fato de as plantas, por serem mais resistentes ao estresse hídrico, encontrarem-se fisiologicamente mais ativas no momento da coleta.

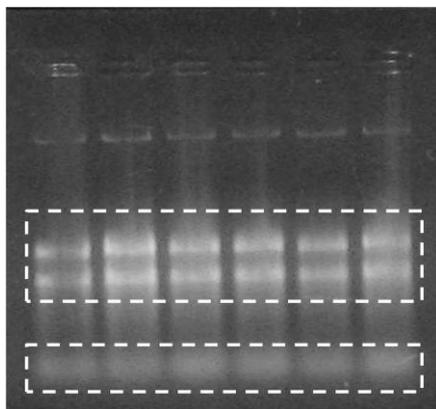


Figura 7 - Gel de agarose 1,6% carregado com amostras de BAT 477 para a verificação da qualidade das amostras extraídas. As duas bandas maiores ao centro correspondem respectivamente as subunidades 18S e 28S do rRNA, as bandas inferiores difusas correspondem ao mRNA

De acordo com a Figura 7, podemos também perceber a pureza das amostra. Quanto a purificação do mRNA da amostra utilizando o *Dynabeads® mRNA Purification Kit*, como mostrado na Tabela 5, os resultados foram também bastante satisfatórios. No total, foram realizadas quatro purificações, com rendimento mínimo de 27,15 ng/ μ l e máximo de 42,9 ng/ μ l. Nem todo o RNA total extraído de BAT 477 foi necessário para a purificação e encontra-se armazenado a -80°C.

Tabela 5 - Quantificação da purificação das amostras de BAT 477 obtidas por espectrofotometria

Identificação da amostra	ng/ μ l	260/280
1	33,83	2
2	42,9	1,94
3	32,97	2,04
4	27,15	2,06

4.2.2 Extração e Purificação de RNA total: Carioca 80SH

No total foram realizadas 12 extrações de RNA total de raiz para Carioca 80SH submetido ao estresse. Os resultados de quantificação e de qualidade de amostra, obtidos por espectrofotometria utilizando *Nanodrop® ND 1000*, encontram-se dispostos na Tabela 6. A Figura 8 mostra um dos géis de agarose 1,6% carregados com amostras de Carioca 80SH para a verificação da qualidade das amostras extraídas.

Tabela 6 - Quantificação das amostras de Carioca 80SH obtidas por espectrofotometria

Identificação da amostra	ng/μl	260/280
1	365,93	1,81
2	408,27	1,74
3	547,64	1,77
4	425,9	1,77
5	305,51	1,85
6	301,96	1,62
7	636,14	1,97
8	271,09	1,96
9	369,26	1,92
10	416,52	2,01
11	299,14	2,01
12	592,37	1,89

Em geral, as extrações de RNA total de Carioca 80SH apresentaram um bom rendimento (Tabela 6), porém ainda assim inferiores aos de BAT 477. A quantidade mínima extraída foi 271,09 ng/μl e a máxima foi de 592,37 ng/μl, com a média geral girando em torno de 350 ng/μl a cada seção de extração. Isso pode estar relacionado ao fato de a planta, por ser mais suscetível ao estresse hídrico, e também apresentar extensão radicular inferior (Figura 9), além disso, pode encontrar-se fisiologicamente bem menos ativa no momento da coleta.

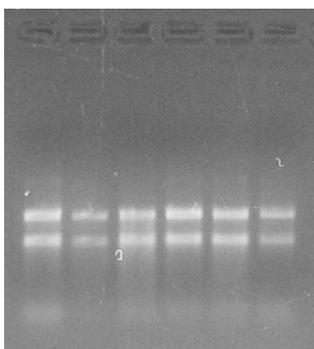


Figura 8 - Gel de agarose 1,6% carregado com amostras de Carioca 80SH para a verificação da qualidade das amostras extraídas

De acordo com a Figura 8, podemos também perceber a pureza da amostra. Quanto a purificação do mRNA da amostra utilizando o *Dynabeads® mRNA Purification Kit*, os resultados foram também bastante satisfatórios. Foi realizada apenas uma purificação, com rendimento de 66,69 ng/ μ l e $\lambda_{260/280} = 1,89$.



Figura 9 - Sistema radicular de ambos os genótipos obtidos no mesmo dia de coleta. Pela foto é possível perceber quão menor é o sistema radicular de Carioca 80SH quando comparado ao de BAT 477

4.3 Construção da biblioteca subtrativa de cDNA

4.3.1 1ª Fase: Obtenção dos cDNA's

4.3.1.1 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD PCR

Após a obtenção das fitas simples de cDNA, referentes as amostra de BAT 477 e Carioca 80SH, estas foram amplificadas por meio LD PCR. Para tanto, por recomendação do fabricante, se fez necessário um procedimento de otimização do número de amplificações necessárias para se obter uma quantidade ótima de fitas duplas de cDNA (*dscDNA*).

Foram testados cinco ciclos de amplificação, os resultados de quantidade e qualidade das amostras foram analisados carregando-se alíquotas de 5 μ l, removidas de cada uma das duas amostras ao final de cada ciclo de amplificação, em um gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto a padrão de 1 kb de DNA. A Figura 10 mostra os resultados obtidos.

Como pode-se perceber, para BAT 477 um rastro bastante pronunciado de amplitude variando entre 500 a 1500 pares de bases foi obtido. Este resultado, de acordo com o manual do fabricante era o esperado e para nossas condições ele foi obtido depois de completados 15 ciclos de amplificação, sendo que após esta fase a reação atingiu seu ponto de saturação. Para Carioca 80SH entretanto, o rastro também pode ser evidenciado, na faixa de 15 ciclos, porém em bem menor quantidade (Figura 10).

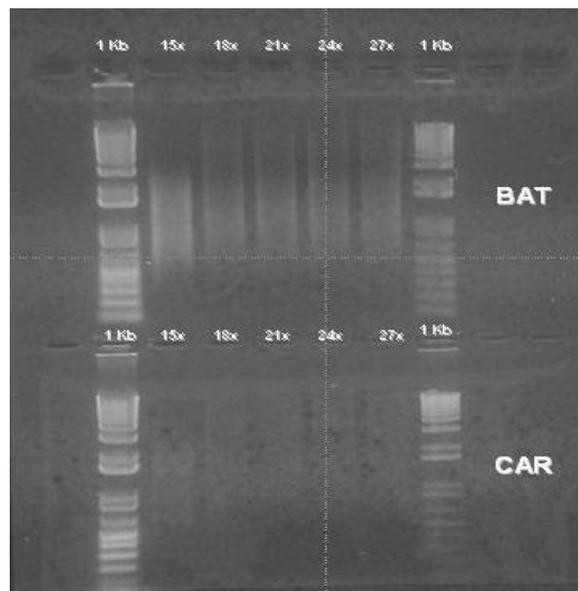


Figura 10 - Gel de agarose 1,2% carregado com amostras de BAT 477 (BAT) e Carioca 80SH (CAR) para a otimização do número de ciclos necessários para a amplificação dos produtos de *ds cDNA*. É possível perceber que para ambas as amostras o ponto de saturação é atingido após 18 ciclos

4.3.1.2 Cromatografia de coluna

Antes de proceder com o processo de purificação das amostras de *ds-cDNA* foram reservadas alíquotas de 7 μ l de cada uma das amostras (BAT e CAR) para análise comparativa em gel de agarose após o processo de cromatografia utilizando *CHROMA SPIN-1000* de acordo com as instruções presentes no manual do *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit*.

Após o processo de purificação das fitas de *ds cDNA* obtidas, foi carregado um gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1 kb de DNA, contendo as seguintes amostras: 3 μ l (dos 7 μ l) dos produtos de *ds cDNA* não purificados (coluna A), 10 μ l do produto de PCR purificado na coluna de cromatografia (coluna B), ou seja, a fração precipitada a 320 μ l de 1x TNE que era desejada para a continuidade do experimento, e 10 μ l da segunda fração (que não seria utilizada), precipitada a 75 μ l de 1X TNE (coluna C) (esta fração foi reservada para eventuais testes posteriores de *primers*).

Após a eletroforese, o resultado objetivado era que o rastro detectado na coluna B (material desejado precipitado com 320 μ l de 1X TNE) deveria ter intensidade maior ou igual a 50% da intensidade do material da coluna A. Conforme podemos notar na Figura 11, nossos resultados foram satisfatórios nesta etapa do trabalho para as amostras das duas cultivares (BAT e CAR).

Quanto à coluna C, as amostras foram carregadas no gel, pois, caso não houvesse presença de *dscDNA* (precipitada a 75 μ l de 1x TNE), isso significaria que o processo de purificação não haveria sido bem sucedido e deveria ser repetido. Porém, conforme podemos perceber pela Figura 11, um rastro bastante forte pode ser evidenciado nessa faixa de precipitação.

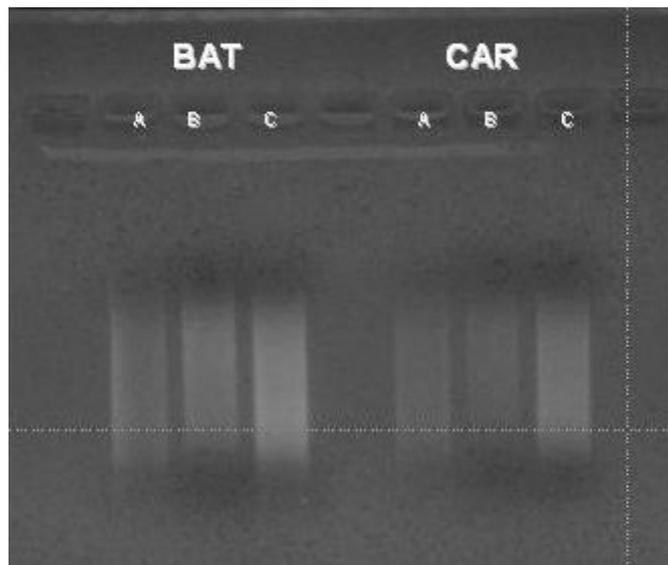


Figura 11 - Gel de agarose 1,2% carregados com amostras de BAT 477 (BAT) e Carioca 80SH (CAR) após cromatografia. A. Produto de PCR não purificado; B. produto de PCR purificado (320ul de 1x TNE); C. produto de PCR purificado (75 ul de 1x TNE)

4.3.1.3 Digestão das fitas de dscDNA

Tendo sido obtido o material purificado, ambas as amostras foram então digeridas com enzima de restrição *RsaI* afim de receberem os adaptadores necessários para o processo de construção da biblioteca de SSH. Para confirmar o sucesso da digestão, 10 ul de cDNA não digerido foram carregados em gel de agarose 1,2%, junto a 10 ul de cDNA digerido com *RsaI*.

Conforme podemos observar na Figura 13, para ambas as amostras (BAT e CAR), os resultados positivos previstos no manual do fabricante foram observados, ou seja, para a amostra não digerida deveria aparecer um rastro mais intenso e de amplitude de 0,5 a 10 kb, e para a amostra digerida um rastro menos intenso e de amplitude de 0,1 a 2 kb.

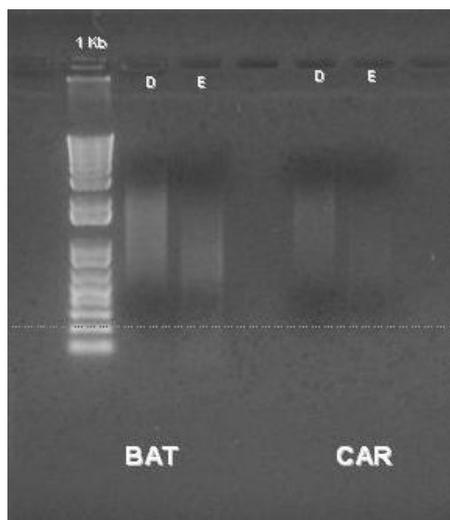


Figura 14 - Gel de agarose 1,2% carregado com amostras de BAT 477 (BAT) e Carioca 80SH (CAR) após digestão com RsaI. D. Produto de PCR purificado não digerido; E. Produto de PCR purificado digerido

4.3.2 2ª Fase: Construção da biblioteca de SSH

4.3.2.1 Purificação da digestão, Ligação dos Adaptadores e PCR da ligação

A amostra *tester* (BAT 477) foi dividida em duas alíquotas exatas e cada uma submetida a uma reação de ligação a um dos adaptadores disponíveis. Em um tubo limpo foram separados, antes da reação de ligação uma alíquota de 2 μ l de cada reação (*tester 1-1* e *tester 1-2*) para ser o controle final não subtraído.

Após a ligação, foi utilizado 1 μ l de cada uma das amostras (*tester 1-1* e *1-2*) para uma reação de PCR visando verificar se ao menos 25% das moléculas de cDNAs possuíam adaptadores em ambas as extremidades. Para nossas condições, optamos inicialmente por realizar 20 ciclos de amplificação (número mínimo recomendado pelo fabricante), em virtude da otimização do tempo, já que este procedimento tinha como objetivo apenas verificar a qualidade da ligação e não tinha objetivo de gerar produtos para os passos seguintes. A qualidade dos produtos

foi confirmada em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA (Figura 13).

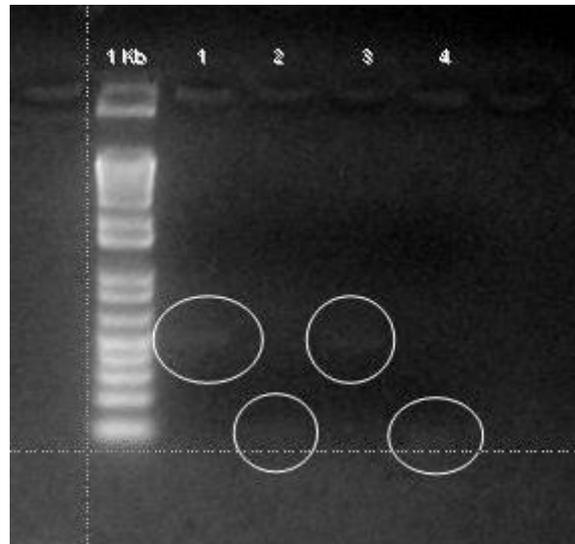


Figura 13 - Gel de agarose 1,2% para análise da ligação. 1. *tester 1-1*: (Adaptador 1), *Primer 3'*, *PCR Primer 1*; 2. *tester 1-1*: (Adaptador 1), *Primer 3'*, *Primer 5'*; 3. *tester 1-2*: (Adaptador 2R), *Primer 3'*, *Primer 5'*; 4. *tester 2-2* (Adaptador 2R), *Primer 3'*, *PCR Primer 1*

Conforme podemos observar na Figura 13, bandas de intensidade muito baixas foram evidenciadas (círculos brancos), e isso deve ser entendido como resultado do número mínimo de ciclos de amplificação empregados (20x). Ainda assim, pela análise do gel podemos verificar a presença de duas bandas mais fortes nas amostras 1 e 3, as quais continham na reação o *Primer 1R*, específico para os adaptadores 1 (presente na amostra 1) e 2R (presente na amostra 3) confirmando assim a eficiência da ligação.

4.3.2.2 Hibridizações e Amplificação das seqüências de cDNA diferencialmente expressas

Nesta etapa, tendo sido concluídos os dois passos de hibridização, os cDNAs diferencialmente expressos foram seletivamente amplificados em duas reações de PCR: uma, utilizando *PCR Primer 1*, para amplificação de moléculas contendo seqüências de diferentes adaptadores em cada extremidade e outra, utilizando *Nested PCR Primer 1* e *Nested PCR Primer 2R*, para enriquecimento das seqüências diferencialmente expressas. A qualidade dos produtos foi confirmada em gel de agarose 2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1 kb de DNA (Figura 14).

Para esta reação de amplificação foram utilizados nas duas reações de amplificação, além do produto da 2ª Hibridização, mais dois produtos controle: material não-subtraído sem adaptadores e material não-subtraído, mas contendo os adaptadores. Conforme podemos perceber pela Figura 14, todos os resultados positivos previstos pelo manual do fabricante foram obtidos.

Analisando as colunas A referentes às duas amplificações (Figura 14), podemos perceber que ao final dos dois processos de amplificação, o produto da 2ª hibridização apresentou um padrão de rastro bastante forte e com amplitude bastante ampla (0,01 a 5kb), confirmando a presença de uma grande quantidade de produto e de boa qualidade, além de transcritos subtraídos com seqüências de número bastante variados em pares de base.

Além disso, os controles adicionam dados na medida em que atestam o sucesso do experimento. A amostra B (colunas B referentes às duas amplificações) na Figura 14 referentes à amostra de cDNA de BAT 477 que havia sido digerida e purificada, porém não havia sido ligada aos adaptadores, por isso, quando submetida ao processo de amplificação com os primers não houve alteração de seu padrão, exibindo o mesmo padrão de arrasto encontrado na Figura 12, coluna E para BAT. Já, para a amostra C (colunas C1 e C2) na Figura 14, de material ligado de cDNA de BAT, porém não subtraído, o padrão de bandas amplificadas confere

com o esperado, ou seja, são semelhantes aos obtidos no gel referente a PCR para confirmar a ligação (Figura 13).

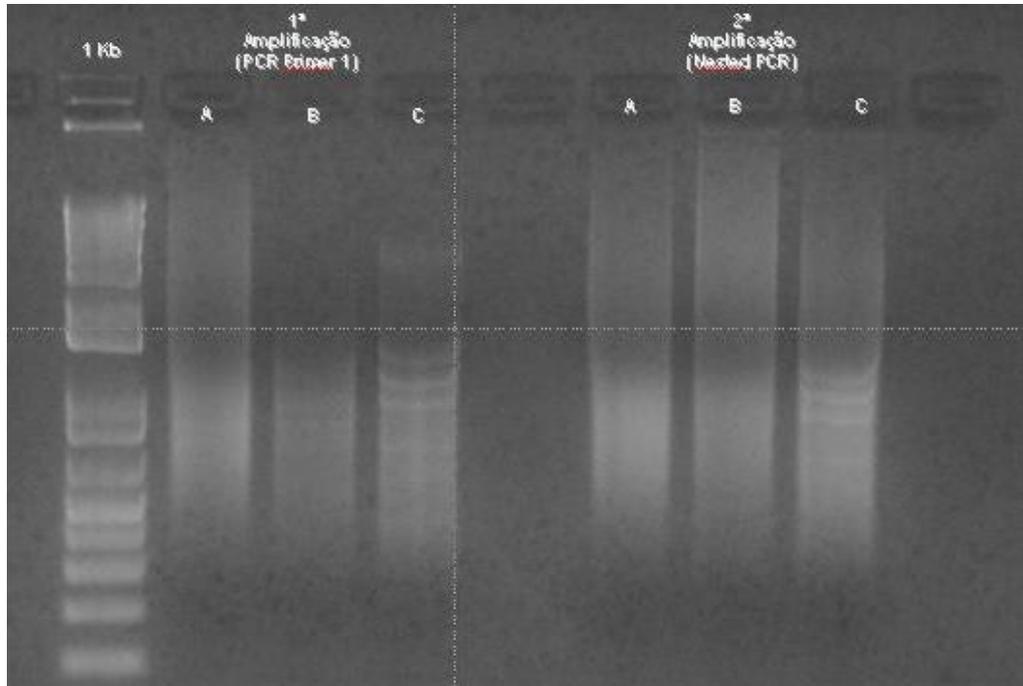


Figura 14 - Gel de agarose 1,2% para análise de amplificação do produto da 2ª Hibridização. A. 2ª hibridização amplificada; B. controle não-subtraído (não ligado a adaptadores); C. controle não-subtraído (ligado a adaptadores)

4.4 Sequenciamento, trimagem e clusterização

De posse do produto final da biblioteca de SSH, foram separadas alíquotas de 7 μ l cada e em seguida aplicadas em um gel de agarose do tipo *Low-melting-point* 1,6% em 1x TSB buffer, junto com padrão de 1kb de DNA. Os fragmentos do gel foram separados em fragmentos menores que 1,5kb (<1,5kb) e fragmentos maiores que 1,5kb (>1,5kb) (Figura 15), excisados com auxílio de bisturi e purificados a partir do gel utilizando *kit* de purificação. O objetivo de se fazer tal separação era obter uma amostragem maior do potencial da biblioteca, ou seja, dessa forma asseguramos que não somente moléculas de cDNA de em média 500bp se ligassem ao vetor da clonagem (tendo a cinética da ligação facilitada pelo tamanho físico),

mas também que moléculas de tamanho (em pares de base) maior também pudessem ser amostradas no sequenciamento.

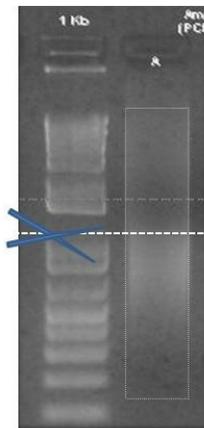


Figura 15 - Altura em que eram conduzidos os cortes da amostra a partir do gel para a purificação dos produtos de PCR

Depois de purificadas, quantificadas e devidamente aliquotadas, as frações de cDNA foram então clonadas utilizando-se vetor pGEM[®] - *T Easy Vector*, e células bacterianas da linhagem *DH5α*. Infelizmente, apesar de que para fragmentos de até 1,5kb a eficiência de transformação bacteriana foi bastante positiva, fragmentos acima de 1,5kb não manifestaram tal eficiência, resultado este devido provavelmente à cinética da reação de ligação dos insertos ao vetor como apontado anteriormente.

Outro fator que deve ser ressaltado é que o protocolo para a transformação bacteriana teve rendimentos, ou seja, número de clones positivos (colônias brancas) por placa, bastante variados, sendo o sistema que emprega bactérias 'quimiocompetentes' consideravelmente mais efetivo que o que emprega células 'termocompetente', fato, aliás que se repetiu durante a clonagem de fragmentos oriundos de outros experimentos de construção de bibliotecas de SSH em nosso laboratório.

No total, foram sequenciadas 17 placas (*Placas 96-well*), sendo cinco placas seguindo o sistema *Dyemamics[®]*, usando o equipamento *ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e as demais 12 placas seguindo o sistema *BigDye v3.1*, em sequenciador *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems)*. O

sequenciamento foi feito de forma uni-direcional (M13F) e os cromatogramas resultantes do sequenciamento em ambos os sistemas foram então analisados todos de forma conjunta valendo-se de ferramentas de bioinformática conforme descrito no item Material e Métodos.

Um site foi criado no Servidor *PowerEdge 2900* da *Dell* para montagem do banco de dados e análises de bioinformática deste projeto e está hospedado no endereço *web*: <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/TS/GU>. Este *site* ainda está protegido, mas assim que os dados forem publicados, as sequências serão depositadas em bancos de dados internacionais.

Na Figura 16 podemos observar o nome das placas, o sentido do sequenciamento (b igual a sentido direto), porcentagem da placa (considerando sequências com no mínimo 400 nucleotídeos com “Phred Quality” ≥ 20), além de *links* que quando acessados levam às sequências *fastas*, às qualidades de cada uma das sequências e aos cromatogramas.

As 17 placas seqüenciadas tiveram uma boa porcentagem de *reads* válidos sendo que a maior foi de 85,3% (GUCCHSH1008) e a menor de 9,4% (GUCCHSH1003), sendo esta placa uma exceção correspondente a uma placa onde tentamos mudar o *primer* utilizado para extensão de M13F e M13R para SP6 e T7 e acabamos por não ter muito sucesso. Acessando o nome da sequência, o programa nos abre uma janela onde podemos analisar visualmente as qualidades de cada um dos *reads* (Figura 17). Na figura em verde claro, encontram-se as sequências com qualidade Phred ≥ 20 ; em rosa, as sequências com qualidade Phred ≤ 20 ; em verde escuro, vetores com sequências com qualidade Phred ≥ 20 ; em vermelho, as sequências com qualidade Phred ≤ 20 e por fim, em azul, o tamanho em número de bases de cada uma das sequências.



Figura 16 - Página web contendo um resumo geral do sequenciamento das placas. Através desta página é possível acessar o relatório de cada reação de sequenciamento, sequências fastas, as qualidades de cada uma das sequências e respectivos cromatogramas

Após a triagem, trimagem, montagem e clusterização das sequências foram obtidos 1572 *reads* válidos (ESTs), sendo que destes 931 constituem-se de *singletons*, ou seja, sequências com cópias únicas, e as demais 189 agrupam-se em *contigs* (sequências de ESTs que se repetem na amostragem) com uma média de seis *reads* por *cluster*, a Tabela 7 mostra as sequências mais abundantes, com maior número de *reads* por *contig* amostrados no experimento.

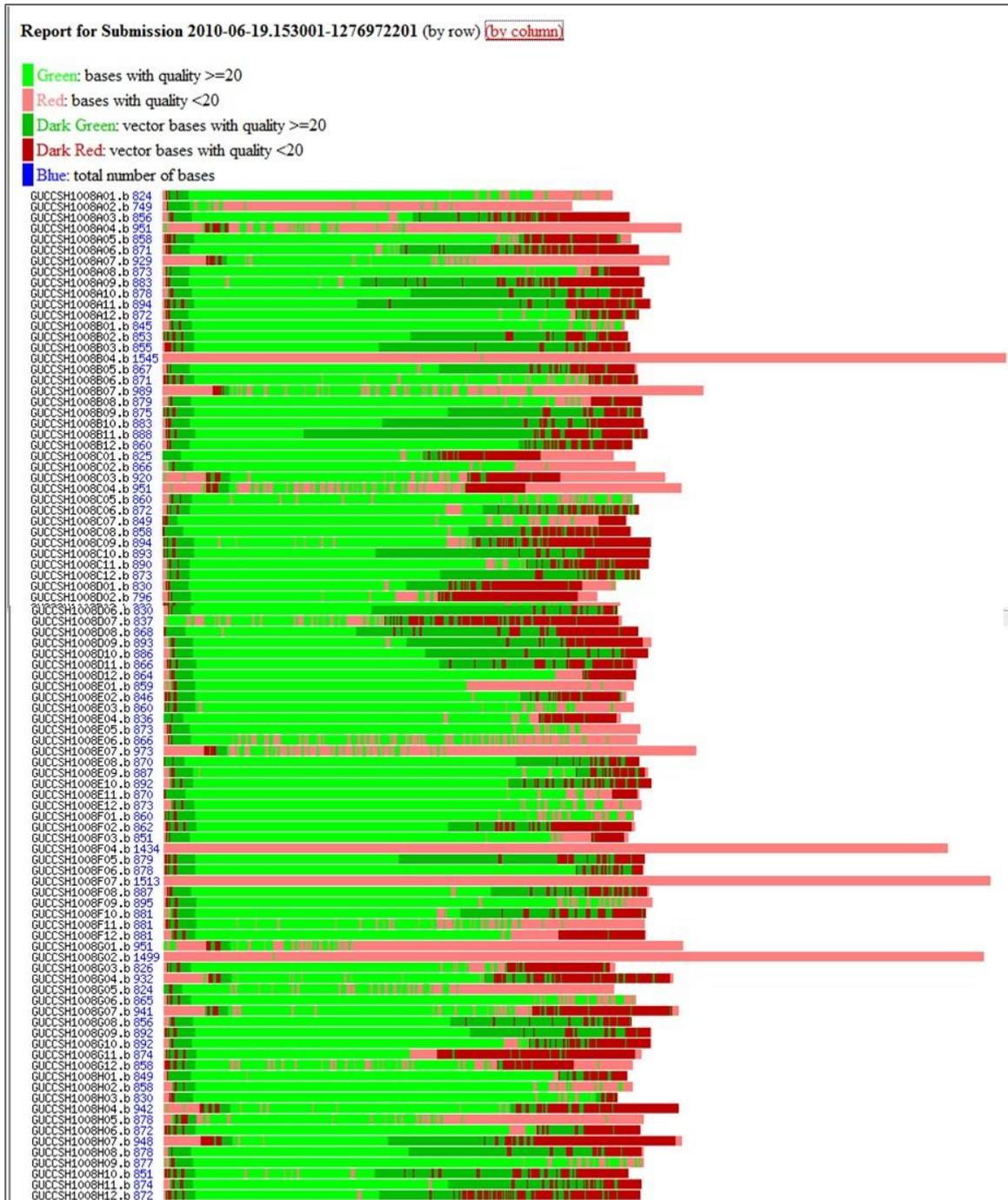


Figura 17 - Análise visual das qualidades de cada um dos reads. Na figura em verde claro, encontram-se as seqüências com qualidade $Phred \geq 20$; em rosa, as seqüências com qualidade $Phred \leq 20$; em verde escuro, vetores com seqüências com qualidade $Phred \geq 20$; em vermelho, as seqüências com qualidade $Phred \leq 20$ e por fim, em azul, o tamanho em número de bases de cada uma das seqüências

Tabela 7 - Contigs referentes aos reads encontrados em maior abundância na biblioteca

Contig	Número de reads no contig	Referência	Descrição	Score	eValue
117	23	gi 238855136	pG1 protein [Lactobacillus jensenii 269-3]	182	1,00E-43
122	18	gi 238855136	pG1 protein [Lactobacillus jensenii 269-3]	165	1,00E-38
143	9	gi 118424407	dissimilatory sulfite reductase beta subunit [uncultured sulfate-reducing bacterium]	257	3,00E-67
24	11	gi 1732556	desiccation protective protein LEA5 [Glycine max]	149	3,00E-34
17	11	gi 130835	RecName: Full=Pathogenesis-related protein 2; AltName: Full=PvPR2	300	1,00E-79
11	5	gi 255584772	histone h2a, putative [Ricinus communis].	127	2,00E-27
127	8	gi 75304713	RecName: Full=S-adenosylmethionine synthase; Short=AdoMet synthase;AltName: Full=Methionine adenosyltransferase; Short=MAT	334	5,00E-90
109	4	gi 240278331	ubiquitin [Ajellomyces capsulatus H143]	144	4,00E-33
108	4	gi 238486086	cyclophilin, putative [Aspergillus flavus NRRL3357]	154	3,00E-36
97	4	gi 1350522	late embryogenesis abundant protein [Picea glauca]	126	3,00E-27
83	4	gi 30682545	ARF3 (ADP-RIBOSYLATION FACTOR 3); protein binding [Arabidopsis thaliana]	232	1,00E-59
80	4	gi 255587991	cation:cation antiporter, putative [Ricinus communis].	165	1,00E-39
79	5	gi 156181612	S-adenosylmethionine decarboxylase [Phaseolus vulgaris]	118	3,00E-25
74	4	gi 42571665	interferon-related developmental regulator family protein / IFRD protein family [Arabidopsis thaliana]	211	6,00E-53
64	4	gi 255637247	EF-hand, calcium binding motif [Glycine max]	162	2,00E-38
52	4	gi 255646048	Gamma carbonic anhydrase-like [Glycine max]	206	2,00E-58
51	5	gi 20138704	RecName: Full=Eukaryotic translation initiation factor 5A; Short=eIF-5A	99	7,00E-40
37	4	gi 1732556	desiccation protective protein LEA5 [Glycine max].	149	3,00E-34
171	7	gi 75304713	RecName: Full=S-adenosylmethionine synthase; Short=AdoMet synthase;AltName: Full=Methionine adenosyltransferase; Short=MAT.	177	1,00E-83

continua

Contig	Número de reads no contig	Referência	Descrição	Score	eValue
164	3	gi 61651606	plastidic phosphate translocator-like protein1 [Mesembryanthemum	238	1,00E-61
162	6	gi 155212489	N3 protein [Glycine max]	192	1,00E-47
154	3	gi 187940303	NAC domain protein [Glycine max]	314	8,00E-84
148	3	gi 194466205	putative L24 ribosomal protein [Arachis hypogaea]	112	2,00E-23
147	3	gi 255579310	pyruvate decarboxylase, putative [Ricinus communis]	272	4,00E-80
145	4	gi 118424359	dissimilatory sulfite reductase beta subunit [uncultured sulfate-reducing bacterium]	114	4,00E-24
142	3	gi 255549412	Vesicle-associated membrane protein, putative [Ricinus communis]	136	8,00E-31
140	3	gi 118424314	dissimilatory sulfite reductase beta subunit [uncultured bacterium]	251	2,00E-65
137	3	gi 146233385	abscisic acid ABA receptor [Populus trichocarpa]	115	1,00E-24
123	4	gi 224094081	Dim1 family [Populus trichocarpa]	151	3,00E-35
105	3	gi 192910730	light-inducible protein ATLS1 [Elaeis guineensis]	135	2,00E-30
98	5	gi 255647862	SINA [Glycine max]	217	8,00E-55
87	3	gi 255639776	alpha-crystallin-type small(s) heat shock proteins (Hsps) [Glycine max]	253	3,00E-71
72	4	gi 255626205	20S proteasome [Glycine max]	295	3,00E-78
61	3	gi 806310	proline-rich protein [Glycine max]	94	7,00E-18
28	5	gi 255540625	glutaredoxin-1, grx1, putative [Ricinus communis]	169	2,00E-40
23	3	gi 255638912	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Glycine max]	430	e-119
14	4	gi 75708857	group 3 late embryogenesis abundant protein [Phaseolus vulgaris]	110	6,00E-23
7	3	gi 83283965	malate dehydrogenase-like protein [Solanum tuberosum]	604	e-171
3	3	gi 184202203	isoflavone synthase 1 [Vigna unguiculata]	320	1,00E-85
2	5	gi 255552798	ATP binding protein, putative [Ricinus communis].	133	8,00E-30

4.5 Análise e anotação das sequências

Após a seleção das sequências, estas foram submetidas a uma busca por similaridade no banco de dados não redundante do NCBI (www.ncbi.com) através da ferramenta *BLASTX*. Sequências redundantes com valor *E-Value* menor ou igual a e^{-5} foram anotadas e os resultados das buscas encontram-se também disponíveis no *site*. Para a anotação das sequências, ou seja, para se inferir uma função putativa para cada EST foi considerado além do *E-Value*, a sequência do banco de dados do NCBI com a qual foi gerado maior alinhamento significativo medido através do *Score*.

Desta forma, uma a uma, cada uma das amostras sequenciadas foram analisadas e anotadas de forma manual. Um sistema automatizado de anotação e categorização de sequências, o BLAST2GO (www.blast2go.org/), foi testado, mas não conseguimos obter grandes resultados com este *software* para a inferência de funções para as EST's e isto se deu principalmente pelo fato de as sequências de *P. vulgaris* L. guardarem sempre alto grau de similaridade com sequências de *Glycine max*, que apesar de ter seu genoma completamente sequenciado, ainda não possui boa parte de seus genes descritos. Desta forma, se fez necessário uma análise manual mais acurada em cada uma das EST's de nossa biblioteca no sentido de se buscar sequências que guardassem grande similaridade com aquelas de outras espécies que já tivessem sido devidamente descritas.

A Tabela 8 mostra os resultados do número de sequências anotadas com sucesso (*singletons* e *contigs*), ou seja, aquelas em que se pôde inferir função com base em descrições do NCBI; sequências '*unknown*', ou seja, aquelas cujos EST's guardam grande similaridade com outros depositados em banco de dados, mas que infelizmente ainda não possuem um papel claramente definido; e por fim, as '*no hit*', ou seja, sequências que não produziram alinhamento significativo com aquelas depositadas no banco de dados, aquelas não classificadas.

Tabela 8 - Número de *reads* anotado com sucesso com base em BlastX e *GOSlim* para plantas. Número de sequências com valores putativos, desconhecidas e hipotéticos.

Classificação	Número de <i>reads</i>
1. Sequências anotadas	896
2. Sequências não classificadas	259
3. Sequências anotadas com função desconhecida	315

Concluída a anotação inicial das EST's, foram obtidas duas listas (uma para *singletons* e uma para *contigs*) contendo as anotações. Para se compreender os mecanismos gerais de resposta ocorrendo na planta quando submetidas ao estresse, ou seja, entender qual o papel desempenhado pelas sequências amostradas, não é suficiente saber apenas qual sua descrição, é necessário organizá-las de acordo com o processo biológico em que estão envolvidas na célula. Tal organização requer um esquema de anotação funcional padronizado (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000). Estes esquemas gráficos de classificação funcional (também conhecidos como '*Rodas Funcionais*') compreendem geralmente hierarquias simples que começam definindo funções em termos mais gerais e vão gerando níveis mais intrínsecos à medida que vão gradualmente se tornando mais específicos em suas definições (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000).

Existem numerosos sistemas de classificação funcional disponíveis em *sites* da internet, incluindo o já citado *software Blast2GO* que integra os sistemas *BlastX* do NCBI com o sistema de categorização funcional do *Gene Ontology Consortium* (www.geneontology.org/), os sistemas *EcoCyc* e *GenProtEC*, ambos versões atualizadas do modelo original de Riley (RILEY, 1998; KARP et al., 1999), versões adaptadas deste que incluem o sistema *TIGR* (FLEISCHMANN et al., 1995), o sistema *MIPS/PEDANT* desenvolvido pelos pesquisadores do *Munich Information Centre for Protein Sequences* (MIPS) e por fim os sistemas *KEGG* (OGATA et al. 1999) e *WIT* (SELKOV et al., 1998) que são mais focados em definições de rotas metabólicas.

Todos estes sistemas foram testados no sentido de se eleger aquele que gerasse o melhor resultado de classificação funcional para as EST's de nossa biblioteca. Infelizmente, acabamos por perceber que nenhum dos sistemas disponíveis atualmente são capazes de sozinhos gerar uma classificação abrangente da biblioteca cobrindo o maior número de sequências possíveis. Tal fato acontece principalmente porque a grande maioria destes sistemas foi desenvolvida tendo como alvo processos biológicos em microrganismos, ou mesmo modelos animais, os quais muitas vezes podem não se enquadrar para plantas e no caso dos modelos automatizados, estes se baseiam em sistemas hierárquicos os mais amplos e detalhados possíveis, a fim de se cobrir o maior número de estudos e espécies possível.

Desta forma, optamos por buscar um sistema de classificação funcional para nossas sequências que se aproximasse o máximo possível da nossa realidade, ou seja, a classificação de genes em processos biológicos em plantas. Três sistemas foram inicialmente eleitos, a ferramenta de classificação automática do *Gene Ontology Consortium*, o *GOSlimViewer* (http://agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer_select.pl), restringindo a pesquisa ao banco de dados de plantas, e dois sistemas de classificação manuais, o sistema CS (*Combination Scheme*) de Rison, Hodgman e Thorton (2000) (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~rison/FuncSchemes/>) e o sistema adaptado para plantas do MIPS *Functional Catalogue Database* (http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html).

Na tentativa de se otimizar o tempo para a classificação funcional dos genes da biblioteca, o primeiro sistema a ser testado foi a ferramenta automatizada *GOSlimViewer*, porém, apesar de este sistema gerar classes funcionais adequadas para nossos objetivos ele não foi capaz de alocar todos os EST's da biblioteca em classes funcionais. Fora isso, como o *Gene Ontology* trabalha com o sistema de três nós (Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular) e também com uma ampla base de dados onde cada autor classifica seu gene de acordo com seu estudo, por muitas vezes, um único gene em nossa biblioteca acabava por receber em média seis classificações distintas, o que para efeitos estatísticos e para aloca-

los adequadamente em vias metabólicas de resposta ao estresse tornava-se inviável (Dados não mostrados).

Apesar disso, o *GOSlimViewer* ofereceu uma vantagem que não havíamos previsto. Muitas sequências às quais havíamos conseguido anotar utilizando a busca por similaridade em BlastX, mas que infelizmente haviam ficado sem função conhecida, ou seja, '*unknown*', acabaram por ganhar uma função molecular já que suas referências no banco de dados do *Gene Ontology* estavam melhor descritas com base em presenças de domínios funcionais conservados.

Baseado nestes fatos decidimos usar o resultado da análise com a ferramenta *GOSlimViewer* como base para uma análise manual e de caráter mais interpretativo que fizemos combinando os sistemas CS e MIPS. Como o sistema MIPS era muito detalhado em classes e subclasses (diversos níveis de complexidade) e por outro lado o sistema CS era muito superficial, decidimos fundir ambos os sistemas criando um sistema de classificação próprio para nosso trabalho que ao mesmo tempo em que não deixasse de abranger os processos biológicos mais importantes em plantas pudesse também dar especial atenção para respostas metabólicas frente ao estresse abiótico. Uma cópia do modelo de classificação adotado encontra-se no Anexo 2. A lista contendo os genes já classificados de acordo com as classes funcionais será disponibilizada futuramente após estes serem devidamente depositados em bancos de dados públicos.

4.6 Análise da abundância dos *reads* nas classes funcionais

As EST's foram classificadas uma a uma em seis classes gerais distintas: 1. Metabolismo; 2. Processo; 3. Transporte; 4. Estrutura e Organização estrutural; 5. Vias de Informação; e 6. Miscelânea.

O número de sequências alocadas em cada uma das classes e subclasses funcionais encontra-se presente na Tabela 9. Conforme podemos notar pelo Figura

18, a subclasse ‘Resposta a estresse\Adaptação’ acabou conforme esperado sendo a mais abundante, com 149 *reads* do total de 896 anotados, comprovando a intensa ativação da resposta molecular da planta ao estresse e comprovando que boa parte destes genes ativados estão mesmo relacionados ao padrão de resposta diferencial característico do genótipo BAT477 frente ao estresse. A Figura 19 mostra as sequências classificadas de acordo com a resposta ao estresse às quais estão relacionadas.

Tabela 9 - Número de *reads* anotados com sucesso dentro de cada uma das classes funcionais com base nos modelos de Rison, Hodgman e Thorton (2000) e MIPS modificados.

Classe Funcional	Número de <i>reads</i>
1. Metabolismo	218
2. Processo Celular	91
3. Resposta à Estresse	149
4. Transporte	117
5. Estrutura/ Organização	143
6. Vias de Informação	178

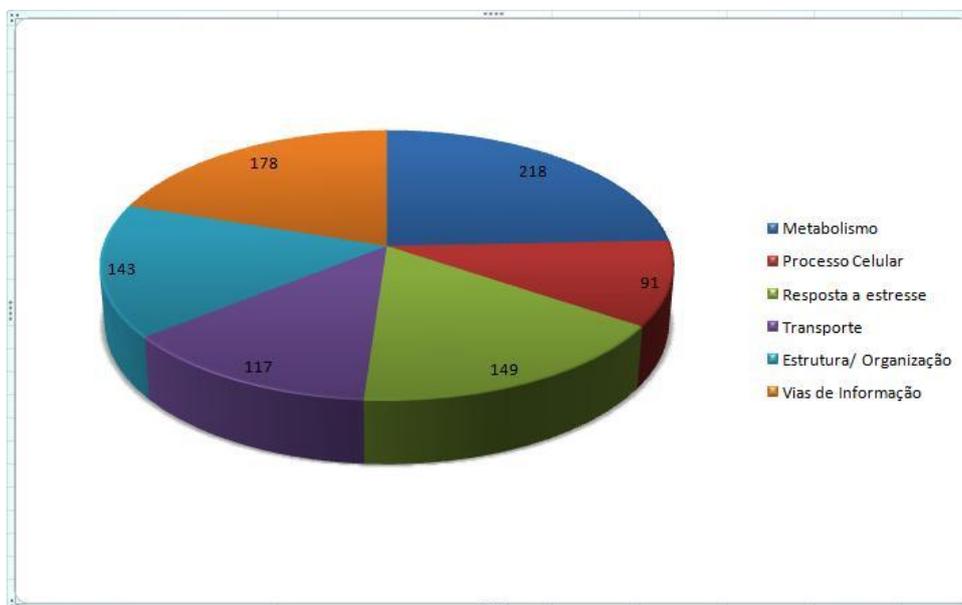


Figura 18 - Gráfico contendo o número de sequências anotadas com sucesso em cada uma das principais classes funcionais com base nos sistemas modificados de Rison et al, (2000) e MIPS

Outra subclasse que se destacou bastante no entanto foi aquela referente ao Metabolismo de Micromoléculas com 114 *reads* do total de 896 anotados. Tal classe se refere ao metabolismo de substâncias essenciais para a manutenção do metabolismo primário/basal da planta, ou seja, aqueles que influenciam a homeostase como aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos graxos, gliceróis, nucleotídeos, nucleosídeos, compostos de nitrogênio, enxofre e fósforo. Juntando-se esta subclasse a duas outras, 'Metabolismo de macromoléculas' e 'Energia', teremos a classe 'Metabolismo', a mais ampla e representativa do total de *reads* anotados, com 218 sequências.

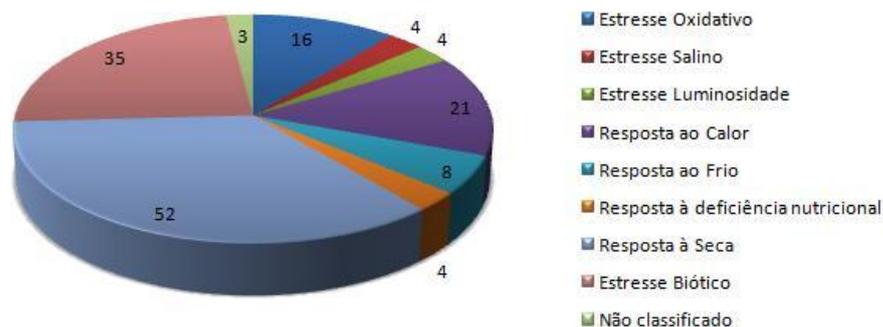


Figura 19 - Gráfico contendo o número de sequências relacionadas de acordo com o padrão típico de resposta ao estresse ao qual estão relacionadas

Plantas sob influência de estresse hídrico acabam ficando sujeitas à intensas alterações metabólicas e de assimilação de carbono, o que justifica o número elevado de *reads* associados à síntese e degradação de micro/macromoléculas e à produção de energia. A queda na assimilação de carbono está diretamente relacionada ao fechamento dos estômatos para evitar a perda de água por evapotranspiração (SOUZA et al., 2004). Por outro lado, estudos feitos com fluorescência de clorofila II vêm demonstrando que o fotossistema II (PS2) é bastante resistente ao estresse, sendo afetado somente se este for extremamente severo (SACCARDY et al., 1998). A seca também afeta grupos de compostos solúveis como açúcares e prolina, cujas concentrações aumentam para regular o balanço osmótico e assim reverter possíveis danos ao metabolismo celular mantendo a homeostase.

Apesar de muitas destas alterações ocorrerem em nível foliar inicialmente, elas irão afetar a planta como um todo na medida em que geram uma resposta integrada que inclui assimilação de carbono e alocação de compostos fotossintetizados em diferentes partes da planta, que no final afetarão sua habilidade reprodutiva, ditando sua sobrevivência e persistência sob o estresse ambiental (CHAVES et al., 2002). No caso das raízes, genótipos com dificuldade de lidar com a situação de estresse tendem a ter uma diminuição de seu crescimento devido à diminuição no acúmulo de reservas no meristema, resultado de queda no metabolismo de carbono e nitrogênio (PINHEIRO; CHAVES; RICARDO, 2001).

Este deve ser, portanto o fator principal que explica tal concentração de EST's oferecidas pela biblioteca subtrativa, envolvidas em metabolismo. O estresse leva a uma resposta metabólica basal elevada, ou no mínimo inalterável, para alguns compostos no genótipo resistente BAT 477, enquanto o genótipo suscetível Carioca 80SH tem seu metabolismo basal reduzido.

Dentre as classes analisadas, aquela que exibiu menor quantidade de EST's (91) foi a categoria dos Processos Celulares (Tabela 9). Tais genes, considerados chaves para a integralização de vias metabólicas e para sinalização celular estão envolvidos em eventos chaves para a sobrevivência da planta como divisão celular, desdiferenciação, apoptose, transdução de sinais, marcação e endereçamento de proteínas. Faz-se necessário, portanto que apesar de representadas em menor quantidade na biblioteca, estas EST's sejam analisadas também com especial atenção já que as sinalizações de vias são induzidas em resposta a estresses ambientais (bióticos e abióticos) e estudos moleculares e genéticos recentes indicam que estas vias estão relacionadas à ativação de diversos dos mecanismos moleculares que são essenciais para a adaptação da planta à situação adversa.

4.7 Principais Vias de Sinalização: sensores, sinalização em cascata, ativação e repressão de rotas metabólicas

Em todas as formas de estresse, sejam elas de natureza abiótica ou biótica, desencadeiam-se uma série de estímulos na planta tais como as já referidas produção de hormônios (ex. ácido abscísico ou etileno) e alterações no potencial elétrico celular (ex. fluxo de Ca^{2+}) que serão percebidos por sensores. Estes sensores irão iniciar uma sinalização em cascata que transmitirá o sinal e ativará fatores de transcrição nuclear que irão induzir a expressão específica de genes e por fim ativar, desativar, intensificar ou reprimir parcialmente rotas metabólicas.

4.8 Vias de transdução de sinais: Transdução de sinais iônicos e osmóticos

A transdução de sinais iônicos e osmóticos é o mecanismo pelos qual as plantas respondem inicialmente aos estresses abióticos, principalmente ao estresse hídrico (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Tal transdução de sinais desencadeará as vias de sinalização iônicas e osmóticas de manutenção da homeostase, vias de resposta a desintoxicação e vias para regulação de crescimento.

4.8.1 Recepção de estímulos na superfície celular: ‘GTP-binding proteins’

Um dos grupos mais abundantes de EST's que encontramos em nossa biblioteca de SSH foram sequências relacionadas a transcritos que codificam para as *GTP-binding proteins* (seis sequências no total). Estas proteínas estão principalmente associadas à regulação de proteínas G (*G protein-coupled receptors*) (em nossa biblioteca representadas por duas ESTs que formam o *contig100*), uma família de proteínas envolvidas na transmissão de sinais químicos fora da célula, causando mudanças no interior da célula (REECE; CAMPBELL, 2002). Elas comunicam sinais a partir de estímulos provocados pela presença, por exemplo, de hormônios, íons ou radicais livres.

As proteínas G operam como receptores trans-membranares. Moléculas sinalizadoras se ligam a um domínio na superfície externa da célula, tal evento ativa um domínio intracelular que ativa uma proteína G e estas por sua vez irão gerar um efeito em cascata que regulará enzimas, canais iônicos, transportadores, e outros mecanismos celulares, controlando transcrição, alongamento celular, secreção e em último caso regulando funções sistêmicas como homeostase (REECE; CAMPBELL, 2002; NEVES; RAM; IYENGAR, 2002).

Os complexos de proteína G se ligam a grupos fosfatos por intermédio de *GTPases* como as *GTP-binding proteins* formando desta forma um sistema que fica ativo quando ligado a um complexo com três grupos fosfatos (GTP) e inativo quando ligados a um complexo com dois grupos fosfatos (GDP) (REECE; CAMPBELL, 2002).

Conforme mostrado na Figura 20, quando uma molécula estimuladora de sinal ativa uma proteína G (1) ela estará induzindo uma mudança conformacional no domínio receptor (2) que permite que este funcione como um GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) que efetuará a troca na subunidade G_{α} de GDP para GTP (3). Esta troca desencadeará a dissociação da subunidade G_{α} (5), ligada a GTP, do dímero $G_{\beta\gamma}$ e do receptor (YUEN, 2010). Ambos G_{α} -GTP e $G_{\beta\gamma}$ podem ativar diferentes cascatas de sinais e proteínas efetoras, enquanto o receptor está livre para ativa a próxima proteína G (6) (YUEN, 2010).

A subunidade G_{α} irá em seguida hidrolisar a GTP para GDP pela sua atividade enzimática, permitindo a reassociação com $G_{\beta\gamma}$ e iniciando um novo ciclo. Um grupo de proteínas chamadas de reguladoras de sinalização por proteínas G (RGSs), agem como proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) (em nossa biblioteca EST GUCCSH1018B08), específicas para subunidades G_{α} . Estas proteínas agem no sentido de acelerar a hidrólise de GTP para GDP e finalização a transdução de sinais. Em alguns casos, o próprio efetor pode possuir atividade GAP ele mesmo, o que ajuda a desativar a via. Este fato é verdadeiro para a fosfolipase C beta (GUCCSH1019D01), que possui atividade GAP dentro da região C-terminal. Esta sendo uma forma alternativa de regulação da subunidade G_{α} .

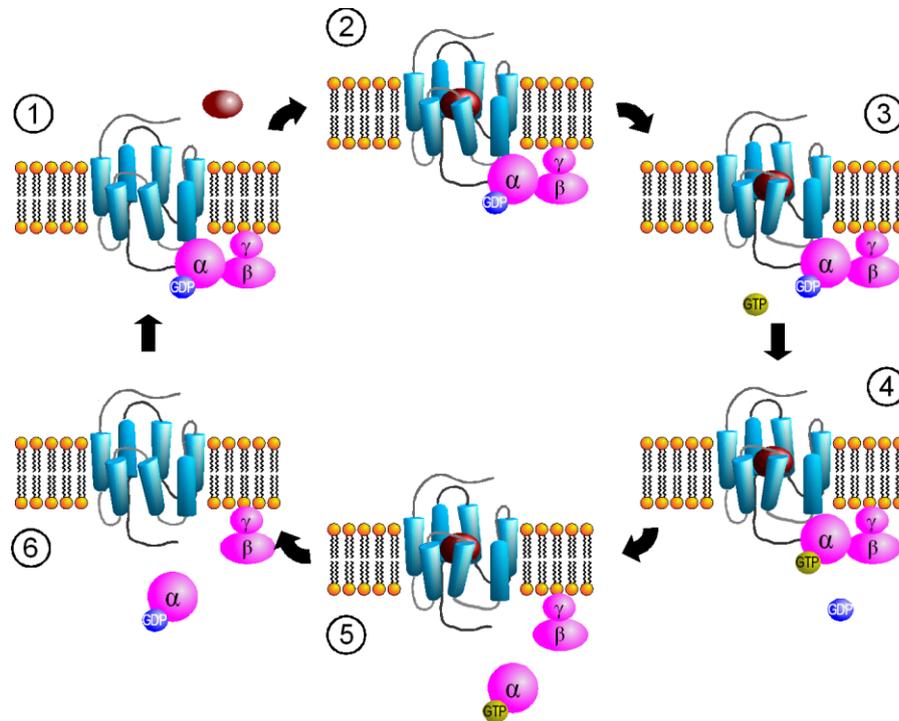


Figura 20 - Ciclo de ativação das proteínas G pelos receptores acoplados de proteína G. Fonte: adaptado de Yuen (2010)

4.8.2 Carregadores, canais, e bombas operando para minimizar a toxidez iônica

Embora a absorção de íons pela célula, via membrana plasmática, providencie o meio mais rápido e eficiente para o ajuste osmótico, em alguns casos, podem perturbar o metabolismo. Em situações de estresse e desequilíbrio osmótico, plantas tendem a acumular Na^+ , em parte devido a um potencial de membrana que favorece o influxo passivo de Na^+ através de canais e carregadores (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Estudos funcionais em leveduras expressando um transportador putativo de K^+ oriundo de trigo, o HKT1, mostraram que existe uma alta afinidade entre os íons Na^+ e K^+ produzindo um sistema de co-transporte, porém em altas concentrações externas de Na^+ o influxo de K^+ passa a ser bloqueado fazendo com que o Na^+ perca afinidade com o transportador e tenha seu influxo inibido (BRAY; BALLEY-SERRES;

WERETILNIK, 2000). Dentre as EST's anotadas pudemos identificar que em BAT477, um sistema similar pode estar ativo. A EST GUCCSH1012E08 codifica para um canal membranar que coordena para o efluxo de K^+ , o kefb regulado pela presença na célula do tripeptídeo glutaciona. Em situações de extremo estresse oxidativo, a enzima glutathiona S-transferase, também amplamente presente na biblioteca (GUCCSH1011D08, GUCCSH1009D04, GUCCSH1007F09, GUCCSH1016G10 e GUCCSH1017H12, além dos *contigs* 15 e 71), promove a ligação de glutaciona a compostos oxidados como lipídios e também a íons que podem vir a ser tóxicos à célula, neste caso providenciando o efluxo de K^+ , nos levando a crer que tal sistema aumenta a concentração deste íon em ambiente extracelular inibindo assim o influxo de Na^+ (Figura 21).

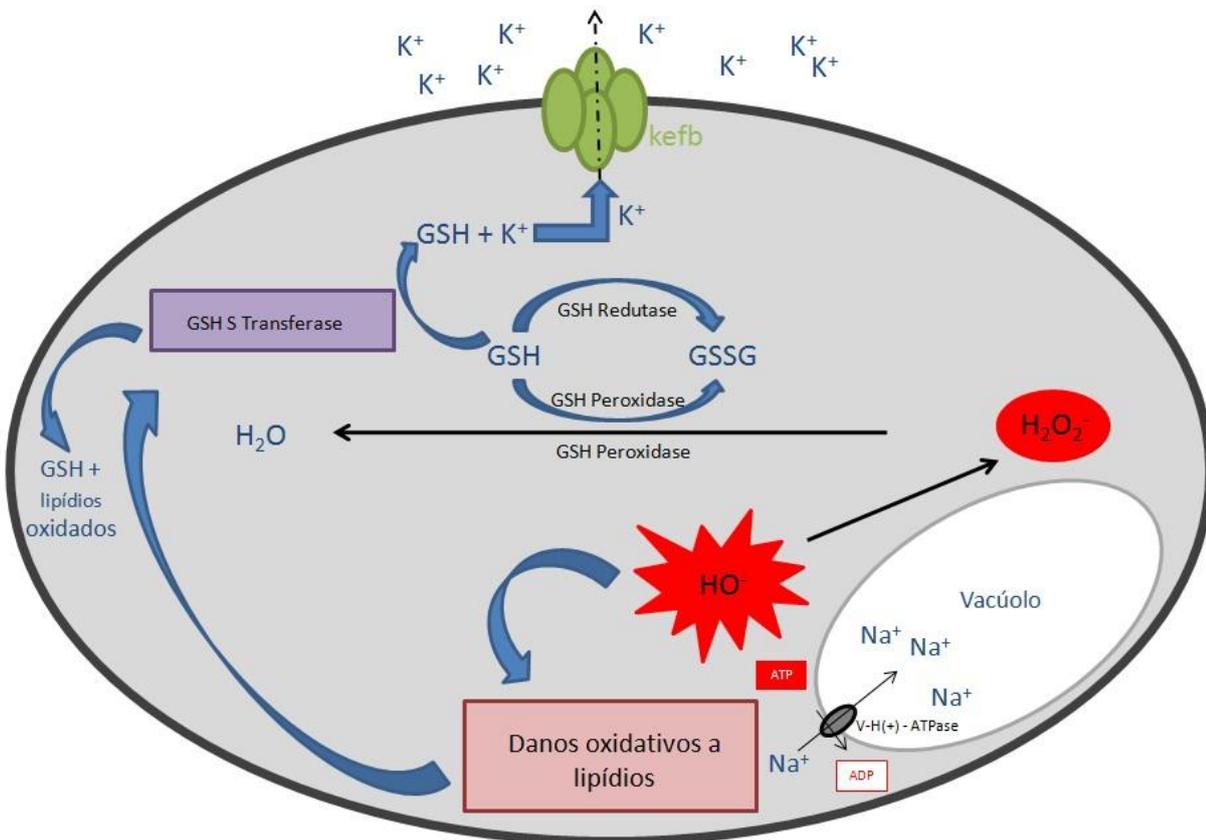


Figura 21 - Canais e bombas transmembranares ativados para minimizar os efeitos de toxicidade iônica durante o estresse. Superior em verde, sistema kefb associado ao tripeptídeo glutaciona (GSH) promovendo o efluxo de íons K^+ para o ambiente extracelular. Inferior em cinza, transportadores V-H(+)-ATPases auxiliando no sequestro de íons Na^+ pelo vacúolo

Outro sistema para a prevenção do acúmulo de Na⁺ no citoplasma das células e que pudemos identificar estar ativo em BAT477 é o sequestro deste íon pelo vacúolo celular. Em plantas com forte acúmulo de Na⁺, transportadores vacuolares Na⁺/H⁺ (sistema *antiporter*) são ativados mediante um potencial químico estabelecido através do tonoplasto por bombas protéicas e promovem tal captura do excesso de Na⁺. Tais bombas protéicas são as chamadas V-H(+)-ATPases encontradas em nossa biblioteca (EST's: GUCCSH1005G08, GUCCSH1011G10 e *contig* 150) (Figura 21).

4.9 Síntese e atividade de Aquaporinas

A natureza hidrofóbica da bi-camada lipídica representa uma considerável barreira para a livre movimentação de água pro interior das células e entre os compartimentos intracelulares. Entretanto, canais protéicos transmembranares conhecidos como aquaporinas tornam tanto membranas plasmáticas como tonoplastos mais permeáveis à água (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). O movimento da água por estes canais podem ser modulados muito rapidamente, ressaltando, portanto sua grande importância para as plantas sob estresse hídrico no sentido em que promovem a recuperação do turgor celular.

Em estudos conduzidos em *Arabidopsis*, o gene *Rd28* que codifica para proteínas da família MIP (*major intrinsic protein*), tem sua expressão amplamente intensificada quando a planta encontra-se sob estresse hídrico. Nestes casos, os níveis de transcritos destas proteínas aumentam consideravelmente no interior das células na medida em estas recuperam gradativamente seu turgor, fato este que vem sendo fortemente correlacionado a um mecanismo de regulação da expressão e aumento na atividade de aquaporinas durante o estresse. Em nossa biblioteca pudemos identificar a presença de três EST's distintas relacionadas à aquaporinas: a GUCCSH1008F11, uma aquaporina similar a tipo PIP2.1 de *Ricinus comunis*, a GUCCSH1012A12, similar a Pip2a de *G. max* e a GUCCSH1018C04, uma aquaporina putativa identificada previamente em *P. vulgaris*.

4.10 Sinalização de estresse osmótico e oxidativo

Uma das consequências diretas do estresse hídrico é o desencadeamento de outro tipo bastante comum de estresse sofrido pelas células, o estresse oxidativo. Tal situação leva a liberação das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) que são formadas durante certas reações redox e durante a redução incompleta de oxigênio ou oxidação da água pelas cadeias transportadoras de elétrons de mitocôndrias e cloroplastos (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Tais compostos como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxil causam extensos danos celulares e podem levar a inibição da fotossíntese (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

No sentido de detectar e eliminar tais compostos extremamente tóxicos, a evolução acabou por selecionar em plantas um conjunto de mecanismos de busca e eliminação destes subprodutos. Tais mecanismos compreendem não somente enzimas, mas também outros compostos como ascorbato, glutathiona, carotenóides, antocianinas e osmólitos como prolinas e açúcares (XIONG; ZHU, 2002).

A Figura 22 ilustra de que forma está organizada uma via de defesa do sistema antioxidante em plantas. Resumidamente, radicais superóxido (O_2^-), são eliminados pela enzima superóxido dismutase numa reação que gera peróxido de hidrogênio H_2O_2 . O H_2O_2 é consumido pela sua conversão em O_2 e H_2O através da oxidação do ascorbato. Ascorbato será regenerado por dois mecanismos. A redução enzimática de monodehydroascorbato ocorre nos plastídios. Alternativamente, monodehydroascorbato que é espontaneamente dismutada para dehydroascorbato podem reagir com glutathiona (GSH) para produzir ascorbato e glutathiona oxidada (GSSG). GSSG é reduzida por glutathiona redutase, requerendo o consumo de NADPH. Íons oxigênio e hidroxila são eliminados na via da glutathiona (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). As principais enzimas desta via foram evidenciadas em nossa biblioteca: catalase (GUCCSH1012A11), as superóxido dismutases (SOD) GUCCSH1005E03 e GUCCSH1009D05, ascorbato peroxidase

(contig 179), outras peroxidases (GUCCSH1008B09/ GUCCSH1014H11/ GUCCSH1017G02 e contigs 110 e 177).

Além destas enzimas, merece destaque outra cuja função ainda não foi bem elucidada, mas que em plantas acredita-se ter especial papel na defesa contra o estresse oxidativo, a thioredoxina peroxidase, representada em nossa biblioteca pela EST GUCCSH1016A08. É forte a evidência de que esta enzima seja o principal fator limitante para a presença de glutathione redutase nas células, um dos principais mecanismos enzimáticos de combate às EROs, sendo o principal doador de elétrons para definir a conformação ativa desta enzima antioxidante.

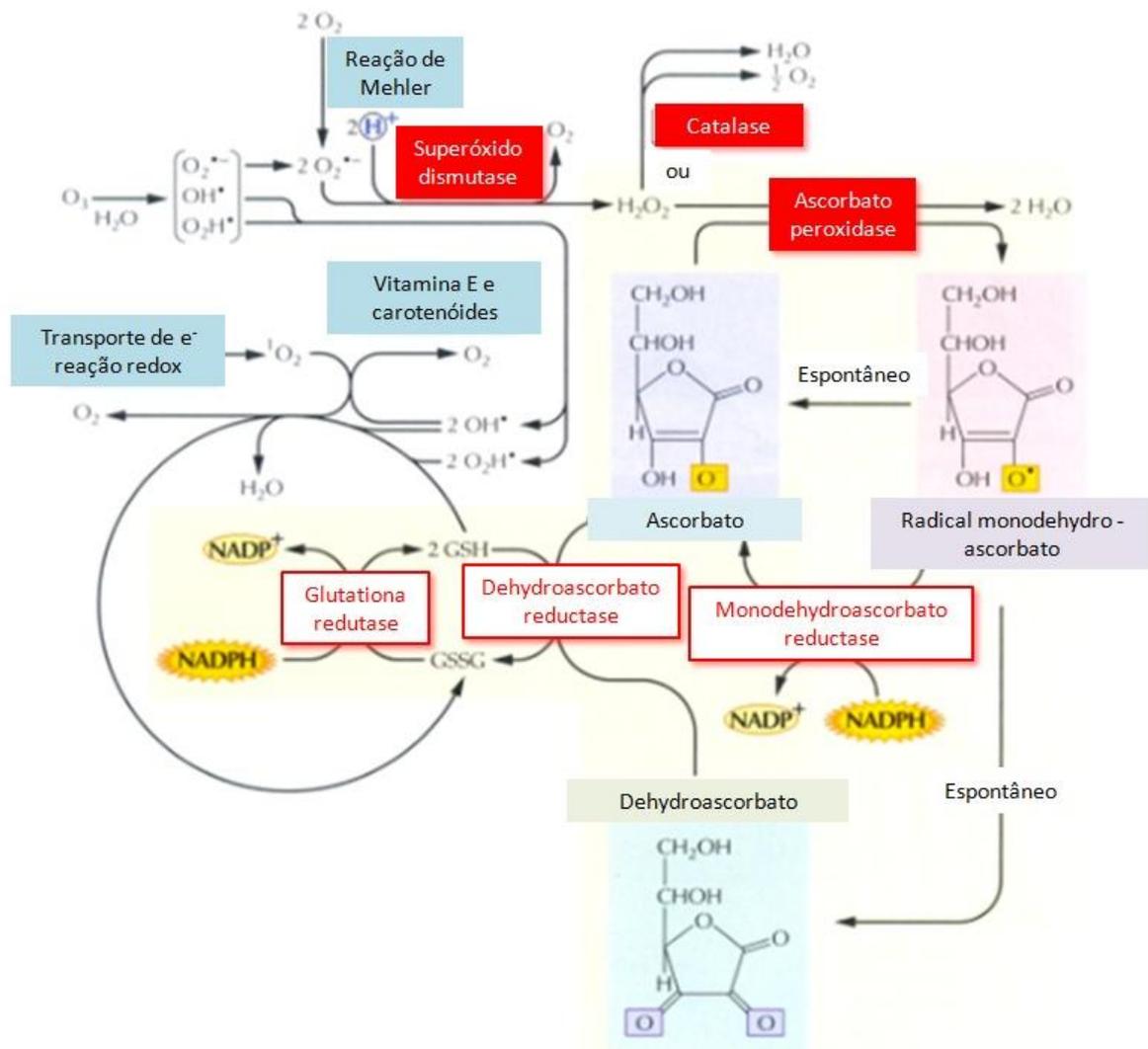


Figura 22 - Via de defesa do sistema antioxidante em plantas detalhando antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os retângulos vermelhos sinalizam para as enzimas cujos transcritos foram encontrados bastante ativos em BAT 477 sob estresse hídrico. Fonte: adaptado de Bray, Balley-Serres e Weretilnik, (2000)

Outra via que sinaliza para um sistema antioxidante é a via MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Tal via é ativada inicialmente por uma série de receptores/sensores como a proteína tirosina quinase, cuja EST correspondente também conseguimos localizar em nossa biblioteca (GUCCSH1019B03), que irão ativar uma série de outras enzimas transdutoras de sinais também conhecidas como *mapks*. As *mapks* irão agir na mediação não somente de respostas ao estresse oxidativo, mas também na manutenção da homeostase assegurando o equilíbrio osmótico. Uma EST provavelmente relacionada à enzima *mapk* também foi encontrada em nossa biblioteca, a GUCCSH1018C12.

Segundo Xiong e Zhu (2002), a via MAPK deve ser encarada como um sistema que opera em módulos, ou seja, após o início do estresse, diferentes MAPK's são ativadas, sendo que suas atividades irão durar por diferentes períodos de tempo. Além disso, um único módulo de MAPK pode ser usado para a transmissão de múltiplos sinais. No geral, podemos entender a via MAPK como módulos de sinais intracelulares que mediarão a transdução de sinais da superfície celular para o núcleo e parecem estar amplamente ligadas à produção de uma ampla gama de osmólitos que são importantes para a manutenção do sistema osmótico (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

4.11 Osmólitos: solutos compatíveis

Segundo Wang, Vinocur e Altman (2003) a função primária básica dos osmólitos é o ajuste osmótico mantendo o turgor celular e conseqüentemente o gradiente osmótico necessário para a retenção de água, entretanto estudos mais recentes apontam para o fato de que estes solutos podem também agir na localização de radicais livres ou como chaperonas estabilizando membranas ou proteínas. Existem três grandes grupos de osmólitos: amino ácidos (e.x. prolina), aminas quaternárias (e.x. glicina betaina) e polióis/açúcares (e.x. manitol, trehalose).

4.11.1. Acúmulo de prolina

O acúmulo de prolina em células sobre estresse hídrico é resultado de duas vias, ou seja, ocorre a ativação da sua biossíntese e a inativação da sua degradação (JINYOU et al., 2004). Em plantas a prolina é sintetizada a partir de ácido glutâmico via *delta(1)-pirrolyne-5-carboxylate* por intermédio de duas enzimas P5C, uma sintetase e uma redutase. Estes dois intermediários foram identificados em nossa biblioteca subtrativa, sendo eles EST's que codificam para proteínas ricas-em-prolina similares as de *G.max* (GUCCSH1012G02, GUCCSH1009F09 e *contig* 61), uma proteína rica-em-prolina similar a de *Medicago truncatula* (GUCCSH1014H09), e proteínas *delta(1)-pirrolyne-5-carboxylate* similares as de *Vigna unguiculata* (GUCCSH1010G01 e *contig* 58), porém não pudemos identificá-las como redutases ou sintetases.

Estudos demonstram que a prolina é um osmo-protetor e que em plantas sob estresse osmótico, seu acúmulo é precedido por um rápido aumento no nível de expressão de P5CS (P5C sintetase) em plantas expostas a estresse hídrico, salino e tratamento com ABA (Strizhov et al. 1997). Experimentos evidenciaram que a proteína P5CS é codificada por dois genes regulados diferencialmente em *Arabidopsis*: o gene *AtP5CS1* que é expresso na grande maioria dos órgãos da planta, mas silenciado em células em divisão e o gene *AtP5CS2* que contribui com 20-40% do total de mRNA de P5CS em tecidos vegetais, mas é o único responsável pela síntese desta enzima em células em elevado ritmo de divisão celular.

4.11.2. Mudanças nas concentrações de açúcares solúveis: trehalose e sacarose

A trehalose consiste de uma forma ancestral de açúcar constituída de duas moléculas de glicose ligadas na forma α -1,1 e conseqüentemente sem extremidades redutoras. É uma das duas únicas moléculas não reduzíveis de açúcar encontradas amplamente na natureza, sendo a outra a sacarose (SCHLUEPMANN, H. et al.,

2003). A trehalose é amplamente conhecida por agir como uma reservada de carboidratos e proteger contra uma ampla variedade de estresses causados por fungos, bactérias e até mesmo insetos, porém em plantas, apesar de estudos apontarem também para este fato tais funções costumam ser mais relacionadas ao acúmulo de sacarose.

A primeira menção à ocorrência de trehalose, e conseqüentemente ao seu papel na resistência ao estresse hídrico em plantas, ocorreu em 1998, quando genes que codificam para a via de síntese desse dissacarídeo foram pela primeira vez reportados em *Arabidopsis* (SCHLUEPMANN, H. et al., 2003). Até então, o papel da trehalose de conferir resistência à seca já havia sido amplamente discutido em leguminosas, porém acreditava-se que o açúcar era sintetizado pelas bactérias simbiotes do gênero *Rhizobium* nos nódulos e que de alguma forma ele era incorporado pelo sistema radicular da planta e então transmitido via xilema para todos os demais órgãos da planta.

A trehalose afeta tanto o metabolismo de açúcar em plantas como a osmo-proteção sendo capaz de refrear a transformação de fosfatídeos celulares de suas formas cristalinas líquidas para um estado sólido e estabilizam a estrutura de compostos com alto peso molecular em situações de estresse hídrico (JINYOU et al., 2004). A via de biossíntese de trehalose (Figura 23a) tem como peça chave a enzima trehalose-6-phosphate synthase, que é codificada pelo gene TPS1 e em nossa biblioteca é representada pela EST GUCCSH1001D04.

Como enunciado anteriormente, em plantas a maior concentração de dissacarídeos acaba se reservando a sacarose. O estresse hídrico induz a conversão de 2-oxulose em sacarose (Figura 23b) sendo este aumento correlacionado ao aumento na expressão gênica de sacarose sintase (*Sus*) e sacarose fosfato sintase (*Sps*) (JINYOU et al., 2004). Na via de biossíntese de sacarose relatada na Figura 23 podemos perceber que em BAT 477, este aumento na expressão da enzima sacarose sintase também ocorre pela presença de EST GUCCSH1015E07.

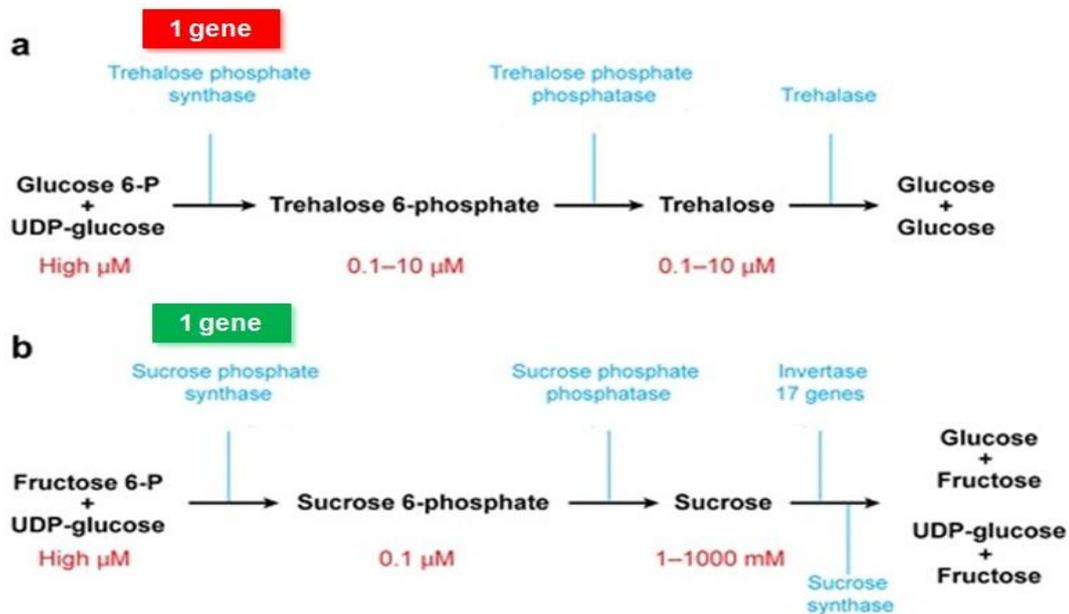


Figura 23 - a. Via de biossíntese de trehalose, o gene identificado em vermelho foi o encontrado em nossa biblioteca. **b.** Via da biossíntese da sacarose, o gene destacado em verde foi o encontrado em nossa biblioteca. Fonte: adaptado de Paul et al. (2008)

4.12 Sinalização dependente de Ca^{2+} que leva a ativação de genes *Lea*

Os íons Ca^{2+} estão envolvidos em várias vias de sinalização intracelular e desta forma, sua concentração nas células é cuidadosamente regulada (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Sua concentração no citosol é baixa, e sobre estímulo, pode ser liberado a partir de reservas intracelulares ou ser transferido para seu interior via carregadores protéicos de Ca^{2+} (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

Em nosso trabalho, podemos perceber a importância deste mecanismo pela presença intensa de EST's que correspondem a carregadores de Ca^{2+} . As EST's GUCCSH1012A07, GUCCSH1009G09, GUCCSH1001B02 e *contig* 64 correspondem cada uma a genes diferentes que codificam para carregadores distintos de Ca^{2+} ainda pouco explorados. O *contig* 80 é o único que difere dos demais, estando relacionada provavelmente a um sistema *antiporter* de cálcio:sódio.

Entretanto, conforme evidenciado pela Figura 24, canais de Ca^{2+} ativados durante o estresse hídrico e promovendo seu influxo para as células, representam apenas um tipo de sensor para a sinalização desses sinais de estresse. Segundo Rodríguez, Canales e Borrás-Hidalgo (2005), CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*, ou proteínas quinase dependentes de cálcio) estão implicadas como importantes sensores de influxo de Ca^{2+} em plantas durante a sinalização para o estresse. CDPKs são serina/trionina proteínas quinases, como as representadas amplamente em nossa biblioteca (ESTs: GUCCSH1015H07, GUCCSH1018D12, GUCCSH1019B03, GUCCSH1009B09, GUCCSH1010H12), que possuem um domínio do tipo calmodulina C-terminal (EST GUCCSH1011C08) com até quatro motivos *ef-hand* que podem diretamente se ligar ao Ca^{2+} . Ainda de acordo com Rodríguez, Canales e Borrás-Hidalgo (2005), CDPKs são codificadas por famílias multigênicas, e os níveis de expressão destes genes são espacialmente e temporalmente controlados ao longo do desenvolvimento.

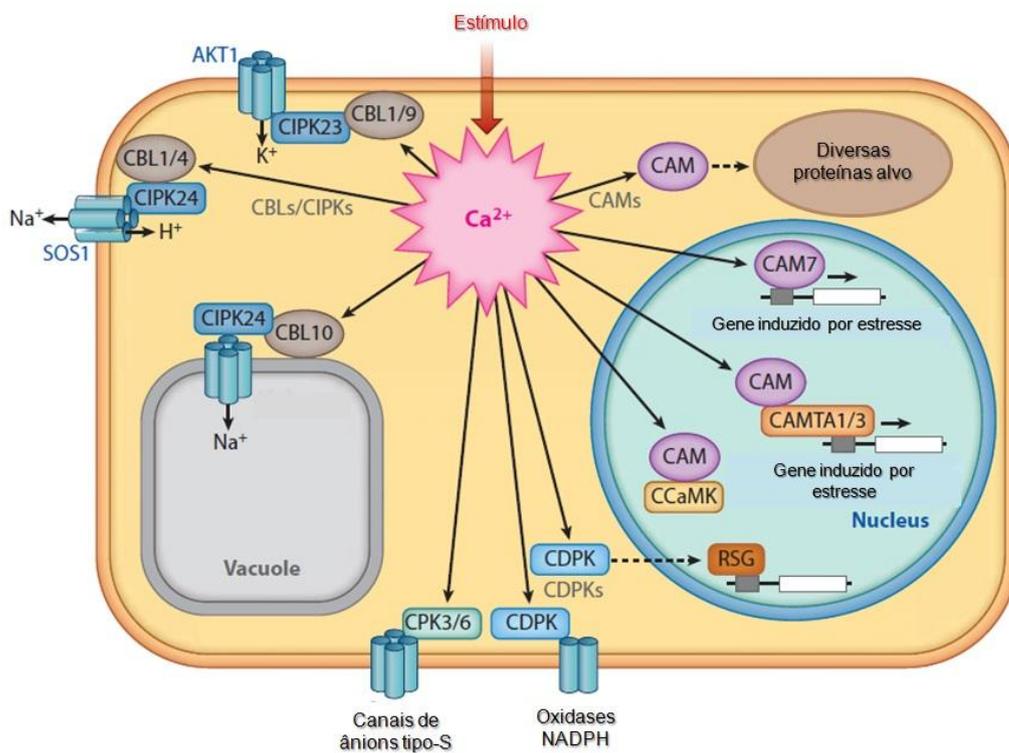


Figura 24 - Uma matriz de mecanismos decodifica sinais de Ca^{2+} e geram respostas altamente específicas que dependem de variações temporais e espaciais nas $[\text{Ca}^{2+}]$. Abreviações: CAM, calmodulina; CAMTA, ativador de transcrição com domínio de ligação Ca^{2+} /calmodulina; CBL, proteína tipo calcineurin-B; CCaMK, quinase dependente de Ca/calmodulina; CDPK, proteína quinase dependente de Ca^{2+} ; CIPK, quinase interativa com CBL; CPK, proteína codificada pela família de genes *Proteínas Quinase Dependentes de Cálcio*; RSG, promotor de *Repressão do Crescimento Caule*; SOS1, sistema *antiporter* de Na^+/H^+ tipo *Sensível a Excesso de Sal*. Fonte: adaptado de Dodd, Kuddla e Dale Sanders (2010)

As vias CDPK parecem estar intimamente relacionadas ao aumento na expressão de genes que codificam para produção de proteínas LEA (SERRANO et al., 2003). Vias que levam a ativação de genes *Lea* incluem uma classe de genes responsivos ao estresse, os (*DRE*)/*C-repeat* (CRT), que difere bastante das vias que regulam a produção de osmólitos descritas anteriormente. Em nossa biblioteca, a EST GUCCSH1016F06 está relacionada a um *cluster* Fe-S pertencente a um gene *DRE*.

Segundo Xiong e Zhu et al. (2002), a ativação de genes *Lea* representam na verdade uma via de reparo a danos causados pela ocorrência do estresse. Estas proteínas são conhecidas por acumular-se nas células de plantas que estão sob extrema condição de dessecação (GARAY-ARROYO et al., 2000). Estas proteínas podem preservar a estrutura protéica de outras proteínas e a integridade de membranas se ligando a moléculas de água, prevenindo assim a denaturação de proteínas ou mesmo renaturando-as, além de agir no sequestro de íons em tecidos estressados, ou seja, ao lado das chaperonas, tem se demonstrado importantes na proteção de macromoléculas, enzimas e mRNAs contra o estresse hídrico (YAMAGUSHI-SHINOZAKI et al., 2002).

Atualmente, estudos vêm demonstrando uma grande variedade de grupos de proteínas LEA, contendo diversas isoformas cada. Como podemos perceber pelos resultados de nossa biblioteca, a grande diversidade de proteínas LEA encontradas em BAT 477 exposto ao estresse (30 ESTs no total) confirma sua importância para a proteção de células vegetais expostas à dessecação. Das 30 ESTs encontradas, 15 correspondem a LEA5 de similares as de *G. max* (GUCCSH1001G03, GUCCSH1015H03, *contig 37* e *contig24*), quatro correspondem a uma LEA2 similar as de *Picea glauca* (*contig 97*), três correspondem a LEA3 de *P. vulgaris* (*contig3*), duas a LEA3 similares as de *G. max* (*contig 132*), três PvLEA-18 de *P. vulgaris* (*contig32* e GUCCSH1016F12), uma LEA4 similar as de *G. tomentella* (GUCCSH1012B03) e uma LEA3 similar as de *Ammopiptanthus mongolicus* (GUCCSH1008B12).

Dentre todas estas ESTs referentes a proteínas do grupo LEA é conveniente ressaltar aquelas pertencentes ao *contig97* que possuem um domínio funcional referente à proteína LEA do grupo 2. Conforme levantado por HARA et al. (2009), proteínas LEA do grupo-2 são uma das principais proteínas expressas durante a dessecação em células vegetais e podem também ser conhecidas pelo nome de dehydrinas. Dehydrinas apresentam todas as funções características de proteínas do grupo LEA, porém de acordo com HARA et al. (2003), dehydrinas podem também atuar como um tampão iônico e/ou tampão osmótico prevenindo o crescimento da força iônica durante o estresse hídrico, desta forma elas agem estabilizando a concentração de íons metálicos livres na célula que livres poderiam formar radicais danosos à célula (HARA; FUJINAGA; KUBOI, 2004).

O Zn^{2+} é um dos metais que segundo Whiting, Broadley e White (2003), pode juntamente com o Ni^{+} , ser ativamente hiperacumulado em células vegetais sob estresse com o intuito de se manter o equilíbrio osmótico, isso sendo numa concentração de até 2% do peso seco da raiz, limite máximo acima do qual tornam-se potencialmente tóxicos para a planta. Sabemos que evolutivamente, poucas espécies vegetais desenvolveram a capacidade de vencer a barreira da toxicidade e passaram a usar metais pesados para manter a homeostase, sendo o genótipo BAT477 aparentemente uma delas. Em nossa biblioteca encontramos uma enorme quantidade de ESTs (11 no total) codificando para transportadores diversos de zinco.

HARA et al. (2009), propuseram estudos que buscavam entender quais os efeitos celulares, ou melhor, qual o resultado da interação de dehydrinas com diversos íons metálicos que costumam acumular no citosol celular durante o estresse, particularmente íons Zn^{2+} , e descobriram que na presença deste íon, e unicamente deste, as dehydrinas acabam por ter uma nova função ativada que é a de se ligar ao DNA e ao RNA estabilizando-o e protegendo-o contra danos advindos do estresse. Esta é, portanto mais uma resposta possível para se entender o porque de tal íon tão tóxico ser acumulado no citosol de algumas espécies vegetais sobre estresse.

4.13 A sinalização mediada por Ca^{2+} e a produção de moléculas regulatórias

Um enorme conjunto de mensageiros químicos estão envolvidos na modulação da concentração intracelular de Ca^{2+} . Os estímulos provocados por este íon estão diretamente relacionados à fosforilação de diversas proteínas produzindo efeitos cascata que culminarão na síntese de diversas outras proteínas ou na ativação de fatores de transcrição, ambos envolvidos com a resposta ao estresse (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Em muitos casos, genes ativados durante a transdução de sinais nestas vias podem estar diretamente relacionados à síntese de moléculas regulatórias tais como hormônios sendo os mais comuns: ABA, etileno, auxina, ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Estes hormônios podem interagir uns com os outros na regulação da sinalização do estresse e na tolerância da plantas.

O hormônio ABA é, dentre os hormônios citados, aquele cujo papel é mais discutido no aumento da resistência de células vegetais ao estresse hídrico. Sob estresses abióticos, plantas tendem a aumentar a biosíntese e o acúmulo de ABA através da ativação de genes que codificam para enzimas biosintetizadoras de ABA, que podem ser rapidamente catabolisadas após o fim da situação de estresse (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005), sendo que todo esse processo é desencadeado por cascatas ativadas por fosfoproteínas dependentes de Ca^{2+} . Além disso, Zhao, Chen e Zhang (2001) afirmam que EROs podem também agir como mediadoras na sinalização celular mediada por ABA e nas rotas que levam a biossíntese desse hormônio.

Podemos afirmar, portanto que tais moléculas regulatórias acabam por iniciar uma segunda rodada de sinalização celular que precede os caminhos originados pelo estímulo por Ca^{2+} discutidos anteriormente, envolvendo componentes totalmente novos e uma multiplicidade de sinais que podem diferir tanto em tempo, como espacialmente, como nos processos biológicos que interferem.

4.14 Regulação da expressão gênica através de fatores de transcrição

Fatores de transcrição (FTs) são proteínas que se aderem a sítios específicos da molécula de DNA com o intuito de ativar ou desativar a expressão de um determinado conjunto de genes (RIECHMANN et al., 2000). A maioria destes FTs pertencem a uma numerosa família de multigenes, sendo que os membros destas famílias podem cada um ao seu modo responderem de forma diferente a cada tipo de estímulo provocado por estresse; por outro lado, alguns genes responsivos ao estresse podem compartilhar os mesmos FTs, como evidenciado pela significativa sobreposição de padrões de expressão gênica que são induzidos em resposta a diferentes estresses (BOHNERT et al., 2001). Como conseqüência, os diversos estresses ambientais frequentemente acabam por ativar vias de sinalização celular e respostas celulares similares tais como a produção de proteínas de estresse, aumento na expressão de antioxidantes e o acúmulo de solutos compatíveis (KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R., 2001).

Desse modo, entender como ocorre a regulação gênica é particularmente importante no caso de traços multigênicos envolvidos na tolerância a dessecação, pois diferentes vias regulatórias determinam a expressão de todo um conjunto de genes (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Infelizmente, o conhecimento sobre estes circuitos regulatórios ainda é escasso; FTs individuais vem sendo caracterizados, mas suas interações com outras moléculas dentro das vias ainda é na sua grande maioria desconhecido.

A regulação da expressão gênica, durante o estresse hídrico, mediada por ABA, envolve uma série de vias de sinalização ativadas por sensores/receptores de ABA encontrados na superfície da membrana plasmática (*contig 137 – abscisic acid receptor*), e diferentes elementos-*cis* ativos presentes nos genes. Em genes regulados por ABA e estresse osmótico, um ou mais *ABA-response elements* (ABREs) adquirem um papel crucial na atividade promotora. Os ABREs possuem uma porção ACGT-contendo motivo G-box. Proteínas que se ligam a esta região promotora ABRE contém motivos básicos de leucina (bZIP). Em BAT 477 sob estresse, conseguimos identificar quatro destes fatores de transcrição *LRR-repeat*

rich protein (GUCCSH1005G09, GUCCSH1001E04, GUCCSH1002B04 e GUCCSH1014H04).

Um outro fator de transcrição estimulado pela presença de ABA é o Asr2 (GUCCSH1010E03) (FINKELSTEIN; GAMPALA; ROCK, 2002). Este fator de transcrição deve estar relacionado à mobilização de carboidratos e na osmoregulação (ATANASSOVA et al., 2003) e vêm sendo inclusive usado como marcador molecular em programas de melhoramento afim de se selecionar genótipos resistentes ao estresse hídrico (FRANKEL et al., 2003). Segundo Bray, Balley-Serres e Weretilnik (2000) a presença destes fatores de transcrição produzidos sob estímulo de ABA nas células (como o fator de transcrição MYB, GUCCSH1008B07), leva a expressão de diversos genes cujos produtos são essenciais para a resposta ao estresse.

Nem todos os genes responsivos ao estresse hídrico são induzidos pela presença de ABA. O elemento de DNA responsivo ao estresse (DRE, também conhecido como *C-repeat*) é um exemplo e também foi localizado ativo em nossa biblioteca sendo representado pelo EST GUCCSH1016F06. Este elemento promotor é comumente responsivo a fatores de transcrição como os DREB (GUCCSH1004A08).

Os fatores de transcrição responsivos ao estresse incluem principalmente membros da família de proteínas de ligação-DRE (DREB), da família dos fatores de ligação a elementos responsivos ao etileno (ERF), da família dos dedos de zinco, da família bHLH (*basic helix-loop-helix*), a família bZIP (*basic-domain leucine zipper*) e a família de fatores de transcrição com homeodomínio. A Tabela 10 evidencia as ESTs referentes a todas estas famílias dos principais fatores de transcrição responsivos ao estresse, e também algumas outras, que foram encontradas em nossa biblioteca e, portanto estão envolvidos na resposta diferencial de BAT477 ao estresse hídrico.

Tabela 11 - Principais famílias de fatores de transcrição e os respectivos transcritos, representados pelos *reads*, encontrados em nossa biblioteca

Família de fator de transcrição	ESTs encontradas na Biblioteca – (Número de acesso e descrição putativa)
DREB	GUCCSH1016F06.b - Full=Fe-S cluster assembly protein DRE2 homolog GUCCSH1004A08.b - DREB [Glycine max]
ERF	GUCCSH1003F08.b - ethylene-responsive element binding factor 4 [Glycine max] GUCCSH1009A02 - transcription factor EIL2 [Vigna radiata] GUCCSH1011C11 - coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing protein
bHLH	
bZIP	GUCCSH1014H04 - transcription factor bZIP70 [Glycine max] GUCCSH1010E04 - leucine-rich repeat protein GUCCSH1002B04 - TGA-type basic leucine zipper protein TGA1.1 [Phaseolus vulgaris] GUCCSH1005G09 - GUCCSH1005G09 GUCCSH1011G06 - NAC domain protein, IPR003441 [Populus trichocarpa].
NAC	GUCCSH1007B04 - NAC4 protein [Glycine max] GUCCSH1018A03 - NAC domain protein, IPR003441 [Populus trichocarpa] Contig154 - NAC domain protein [Glycine max]
MYB	GUCCSH1008B07 - MYB transcription factor MYB185 [Glycine max]
GATA - factors	GUCCSH1008C09 - GATA transcription factor, putative [Ricinus communis].
WRKY family	GUCCSH1008F06 - WRKY36 [Glycine max]
Ubiquitous factors TFIIA e Sp1	GUCCSH1012H02 - transcription initiation factor ia, putative [Ricinus communis]
IAA (auxin – responsive)	GUCCSH1008C03 - Auxin-responsive protein IAA1, putative [Ricinus communis].
	GUCCSH1008G10 - auxin-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]
GRAS	GUCCSH1012C05 - GRAS family transcription factor [Populus trichocarpa] GUCCSH1019H05 - GRAS family transcription factor [Populus trichocarpa]
Fatores heteroméricos	GUCCSH1012H12 - transcription factor CCAAT [Lotus japonicus]. GUCCSH1002G01 - translation initiation factor eif-2b beta subunit, putative
eIF2 – alpha family	[Ricinus communis] Contig51 - RecName: Full=Eukaryotic translation initiation factor 5A; Short=eIF-5A <i>continua</i>
Zinc finger	GUCCSH1016B06 - C2-H2 zinc finger protein [Glycine max]. GUCCSH1011A02 - putative zinc finger protein [Arabidopsis thaliana] GUCCSH1014D02 - CCCH zinc finger DNA binding protein [Ajellomyces capsulatus]

Até o momento, mais de 30 famílias de fatores de transcrição foram preditas somente em *Arabidopsis* (RIECHMANN et al., 2000). Membros da família DREB ou CBF, MYB, a já citada bZIP, e as diversas famílias de dedos de zinco vem sendo muito caracterizadas na regulação da defesa e resposta da planta ao estresse. A maioria destes fatores de transcrição regula a expressão de seus genes alvo através da ligação aos respectivos elementos-*cis* nos promotores destes genes. Numerosos relatos sugerem que a super-expressão destes fatores de transcrição, tais como os DREB (KASUGA et al., 1999), podem levar a um aumento na tolerância a seca, salinidade, ou frio em *Arabidopsis* ou outras espécies de plantas.

NAC (NAM, ATAF, e CUC) é uma família específica de genes, e a maioria das proteínas NAC possuem um domínio N-terminal de ligação ao DNA altamente conservado, uma seqüência de localização de sinais nucleares, e um C-terminal variável (HU et al., 2006). Os elementos-*cis* dos fatores de transcrição NAC foram inicialmente detectados em petúnias (gene *NAM*) e em *Arabidopsis* (gene *CUC2*) (SOUER et al., 1996; AIDA et al., 1997), envolvidos no desenvolvimento de meristema apical. Outros genes *NAC* identificados foram associados à estimulação do crescimento do sistema radicular lateral dependente de estimulação por auxinas (XIE et al., 2000) quando da presença de sinais de estresse abiótico, como estresse hídrico, sendo este o mais provável mecanismo responsável pela presença de ESTs em nossa biblioteca relacionadas a este fator de transcrição tais como: as GUCCSH1011G06 e GUCCSH1018A03 similares a NAC IPR003441 de *Populus trichocarpa*, GUCCSH1007B04 similar a NAC4 de *G. max*, e o *contig154* relacionado a proteína NAC de *G. max*.

Outro fator de transcrição encontrado em nossa biblioteca e que pode estar fortemente relacionado à resposta de BAT 477 ao estresse hídrico é o GATA representado pela EST GUCCSH1008C09. Os fatores de transcrição GATA estão intimamente implicados na assimilação de nitrogênio pelas plantas (OLIVEIRA; CORUZZI, 1999), algo que como discutimos anteriormente, foi o objetivo primordial que estabeleceu o programa de melhoramento que resultou no genótipo BAT 477.

Fatores nucleares Y (NF-Y), como o representado pela EST GUCCSH1001C09, são fatores de transcrição ubíquos, com grande afinidade por promotores contendo *CCAAT box*, e compostos de três subunidades: NF-YA, NF-YB e NF-YC, sendo esta última aquela que foi representada em nossa biblioteca. Li et al. (2008), descobriram que tais transcritos são fortemente induzidos em tecidos vasculares e células guarda sobre mediação de ABA em *Arabidopsis*, e que estes possuem um sítio alvo para miR169 (um micro RNA), que marca moléculas de mRNA para clivagem ou repressão transcricional. Foi descoberto que miR169 é reprimido pelo estresse hídrico durante ativação de vias de sinalização de ABA, portanto a super-expressão de mi169 providencia um efeito nocaute de NF-Y em plantas causando, por exemplo, maior perda de águas pela folha. Em contraste, plantas transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando NF-Y demonstraram significativa redução na perda de água pelas folhas e se mostraram mais resistentes à seca.

Estes fatores de transcrição, e também muitos outros não classificados cujas ESTs foram identificadas em nossa biblioteca, seriam capazes de regular vários genes responsivos a estresse de forma cooperativa ou separadamente, e podem constituir redes gênicas (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Na ativação de genes responsivos ao estresse abiótico, parece que não existe uma regra geral relacionando qual classe ou família de fatores de transcrição ativa quais classes de genes. Ao invés disso, pode haver diversos tipos de fatores de transcrição regulando um grupo de genes responsivos ao estresse, ou mesmo diversos fatores de transcrição que podem cooperativamente ativar o mesmo gene (XIONG; ZHU, 2002).

4.15 As RNA helicases e sua relação com o estresse abiótico

Em solução, a molécula de RNA é dobrada em estruturas secundárias via pareamentos intra- e/ou inter-moleculares das bases nitrogenadas (OWTTRIM, 2006). Funcionalmente, os RNAs são similares a proteínas onde a forma ativa é baseada na estrutura secundária e terciária da molécula e não necessariamente na sequência de nucleotídeos das subunidades das quais é composto (OWTTRIM,

2006). Estas estruturas secundárias são caracterizadas por rearranjos catalisados predominantemente por membros de duas famílias, as RNA helicases e as RBPs (*RNA-binding proteins*) (OWTTRIM, 2006).

A maioria das RNA helicases pertencem a superfamília 2 (SF2), uma subclasse de helicases que possuem grande homologia de sequências dentro de domínios com oito ou nove motivos conservados de aminoácidos (OWTTRIM, 2006). As helicases deste grupo (SF2) são comumente conhecidas como DEAD, DEAH e DExH/D e são diferenciadas entre si por pequenas variações dentro de um domínio conservado que possuem (Asp-Glu-Ala-Asp), sendo que as demais sequências fora deste motivo é que providenciarão especificidade para RNAs alvo (OWTTRIM, 2006).

Segundo OWTTRIM (2006), bioquimicamente as RNA helicases são moléculas motoras que separam moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) afetando no processo o rearranjo da estrutura secundária de RNA e assim ativando sua função molecular na célula. Estas observações vêm nos últimos anos aumentando drasticamente a amplitude das atividades fisiológicas catalisadas pelas RNA helicases.

Em nossa biblioteca encontramos uma EST codificando para uma RBP, a EST GUCCSH1005G02 além de quatro RNA helicases: a GUCCSH1010H02 similar a DRB4 de *Arabidopsis*, a GUCCSH1001H09 similar a uma RNA helicase de *V. radiata*, a GUCCSH1004E03 similar a DEAD/DEAH *box* helicase de *R. communis* e a GUCCSH1017C07 similar a eIF4A-10.

Ainda existem poucos relatos associando RNA helicases com mecanismos celulares de resposta ao estresse abiótico. Estudos recentes vêm indicando que a expressão e atividade das RNA helicases dos tipos exatamente iguais aos representados em nossa biblioteca são ativadas em uma variedade de estresses tais como os provocados por alterações de temperatura, luz, oxigênio e osmoralidade (OWTTRIM, 2006) e sua regulação deve estar associada às mesmas vias de sinalização e resposta já citadas anteriormente.

As RNA helicases ocupam uma posição pivotal na regulação da expressão gênica sendo que sua própria expressão pode ser ambientalmente regulada e quando ativadas podem se caracterizar como importantes ferramentas que regulam a expressão ou atividade de mRNAs alvos ou RNAs funcionais (OWTTRIM, 2006). Além disso, a atividade dos produtos protéicos resultantes da tradução destes mRNAs podem estar envolvidos nos processos de adaptação celular à condição de estresse.

4.16 Respostas adicionais a manutenção da homeostase e desintoxicação

Ao longo da evolução, as células incorporaram mecanismos bastante eficientes para evitar que erros na transmissão da informação genética se propaguem na replicação, na transcrição e na tradução. Ainda assim, com todo esse cuidado de assegurar que a sequência de aminoácidos esteja correta, ainda é possível que uma proteína não consiga desenvolver suas funções por erro no enovelamento. Na verdade, uma quantidade significativa de proteínas precisa de ajuda para atingir a configuração terciária correta (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Essa ajuda é fornecida por uma família de proteínas que, além de auxiliar o enovelamento protéico, encaminha a proteína à destruição, caso não seja possível atingir a configuração correta. Estas proteínas são chamadas de chaperonas que utilizam energia da hidrólise de ATP para o desenovelamento de proteínas, possibilitando o enovelamento para a estrutura correta (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

Durante a resposta da célula ao estresse, seja ele biótico ou abiótico, vias metabólicas inteiramente novas são ativadas, enquanto outras são reprimidas, tudo isso em intervalos de tempo muito curtos e simultaneamente em diversos espaços intra e extra- celulares (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Desta forma, podemos esperar que uma grande quantidade destas chaperonas estejam presentes para prevenir erros, ou danos estruturais, a proteínas que são essenciais para a sobrevivência do organismo.

Diversas proteínas como as dos grupos LEA (dehidrinas) possuem essa função de chaperonamento de outras proteínas (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005). Outras proteínas bastante conhecidas e que possuem a função de chaperonamento são as *heat-shock proteins*. Estas proteínas, expressas principalmente quando a célula é exposta a situações de extrema temperatura ou estresse, são transcritas sob a função regulatória de fatores de transcrição Hsfs, e tais quais as chaperonas, assistem na montagem, distribuição intracelular, acúmulo e degradação de proteínas ajudando assim a manter a situação de homeostase de proteínas vitais durante situações extremas (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005).

Inúmeras ESTs relacionadas provavelmente a chaperonas e proteínas *heat-shock* foram encontradas como sendo vitais na resposta de BAT 477 ao estresse hídrico, sendo 20 ESTs referentes a proteínas *heat-shock* e oito referentes a chaperonas.

Quando, porém as chaperonas não conseguem corrigir danos estruturais às proteínas, ou estas estão em excesso ou mesmo não são mais necessárias, um outro conjunto de proteínas entra em ação com o sentido de eliminar tais produtos que em concentrações elevadas podem acabar sendo tóxicos à célula. É neste ponto que entram em ação as chamadas ubiquitinas (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000).

A ubiquitina é uma proteína encontrada em células eucarióticas que marcam proteínas indesejadas para que estas sejam degradadas em organelas especializadas, as proteassomas, complexos de proteínas capazes de degradar praticamente qualquer proteína em oligopeptídeos. Em nossa biblioteca 18 ESTs foram encontradas codificando para ubiquitinas, além de duas ESTs que codificam para proteassomas 26S: a GUCCSH1017A08 similar a de *Nicotiana benthamiana* e a GUCCSH1009A12 similar a de *Ricinus communis*.

4.17 Nodulinas e a fixação de N₂ durante o estresse

A cultura das leguminosas é agronomicamente e economicamente importante devido a sua habilidade de assimilar o nitrogênio atmosférico (N₂) através do desenvolvimento de uma relação de simbiose com um grupo de bactérias do solo pertencentes ao gênero *Rhizobia* (CLEMENT et al., 2006). Uma complexa rede de troca de sinais ocorre entre ambos os organismos levando ao desenvolvimento de um novo órgão, o nódulo radicular (LONG, 2001). Entretanto, o estabelecimento e a manutenção de uma simbiose funcional é extremamente sensível a estresses ambientais (ZHRAN, 1999). O estresse hídrico leva a uma significativa redução na capacidade de fixação de N₂ e leva, quando aplicado entre as fases de preenchimento de vagem e maturação de sementes, a uma redução de até 50% na produção (SERRAJ; SINCLAIR; PURCELL, 1999).

Muitos estudos direcionados para a redução do efeito do estresse hídrico sobre a fixação de N₂ vêm focando seus esforços em selecionar linhagens de bactérias resistentes ao estresse (CLEMENT et al., 2006). Entretanto, embora estas linhagens tendem a aumentar a osmo-tolerância do nódulo, ainda não foi demonstrado que o efeito seja suficiente para produzir elevados níveis de fixação biológica de N₂ sob estresse hídrico. Exatamente, novos estudos vêm focando nos mecanismos que influenciem a formação e o crescimento de nódulos sob o déficit hídrico (CLEMENT et al., 2006).

É sabido que o genótipo BAT 477 foi selecionado inicialmente com o intuito de ampliar o processo de nodulação em suas raízes e assim ampliar a capacidade desta planta em fixar N₂, melhorando a produção (KIPE-NOLT; GILLER, 1993). Até aonde tal processo é o principal diferenciador que leva a cultura a ser resistente ao estresse hídrico ainda não é comprovado, porém em nosso experimento foram detectadas três ESTs cujas função estão relacionadas a nodulinas, proteínas conhecidas por estimular a formação (e conseqüente aumento) dos nódulos radiculares. As ESTs correspondem a uma nodulina da família MEN21 (GUCCSH1012E10), uma nodulina putativa (GUCCSH1001G08) e uma nodulina da família ENOD18 de *Arabidopsis* (GUCCSH1008A12).

Além das nodulinas, existe um outro conjunto de genes conhecidos como *Rab* que coordenam o processo pelo qual a endocitose da bactéria ocorre quando estas invadem as células meristemáticas do sistema radicular da planta. Este processo ocorre destruindo a membrana plasmática da célula da planta e fundindo novas vesículas membranares formando a membrana peribacterióide (CHEON et al, 1993). Esta alta concentração de membrana peribacterióide é que permite a permanência do simbiote na célula e são os genes *Rab* que coordenam o transporte vesicular de proteínas para a sua formação (CHEON et al, 1993). Em nossa biblioteca pudemos identificar sete proteínas Rab: a GUCCSH1017F08 e GUCCSH1012C01 similares a Rab7p de *G. max*, a GUCCSH1006E02 similar ao domínio RabGAP/TBC de *Arabidopsis lyrata*, a GUCCSH1005F11 similar a RAB1C de *Lótus japonicus*, a GUCCSH1009B06 similar a Rab7 de *Aspergillus flavus*, a GUCCSH1017D04 similar a uma GTP-binding SEY1 e a GUCCSH1018B07 similar a RabA2 de *P. vulgaris*.

4.18 O efeito da mucilagem e de polissacarídeos na proteção contra dessecação

Hidrocolóides de polissacarídeos como as mucilagens podem ocorrer em altas concentrações em diferentes órgãos das plantas, embora todo seu potencial fisiológico ainda não seja conhecido. Mucilagens são encontradas em rizomas, raízes e no endosperma de sementes onde são conhecidas como importantes reservas de energia, embora tal função não seja importante quando encontradas em folhas (CLIFFORF et al., 2001). Estudos feitos na mucilagem das folhas demonstraram que elas podem conferir importante proteção contra geadas (GOLDSTEIN; NOBEL, 1991), transporte de água (ZIMMERMANN et al., 1994), interação planta-patógeno e balanço osmótico das células (DAVIS et al., 1986).

Devido à alta concentração de grupos hidroxila nos polissacarídeos, mucilagens geralmente possuem uma alta afinidade por moléculas de água (alta capacidade de ligação) e isto tem levado a estudos que tentam explorar seu papel na dinâmica planta-água (CLIFFORF et al., 2001). Foi sugerido que a capacidade

das mucilagens em hidratar pode oferecer às plantas um mecanismo de resistência à seca. Em *Hemizonia luzifolia*, mucelagens extra-celulares demonstraram estabelecer um efeito de tampão no potencial hídrico da folha contra flutuações ambientais durante o meio do dia agindo principalmente como um capacitor apoplástico (MORSE, 1990).

Estudos conduzidos por Clemente et al. (2001) explorando a composição da mucilagem em duas espécies arbóreas, *Ziziphus mauritiana* e *Z. rotundifolia*, bem como seu papel contra a dessecação demonstraram a presença em ambos os casos de predomínio de três açúcares: glicose, galactose e rhamnose. A presença de rhamnose foi o fator primordial que nos chamou a atenção já que curiosamente encontramos uma EST em nossa biblioteca, a EST GUCCSH1001F05, que expressa para uma enzima L-rhamnose síntase. Estudos de microscopia seriam necessários a fim de se detectar se existe mesmo um aumento na formação de mucilagem no entorno das células radiculares e rizomas do genótipo BAT477, mas não seria surpresa obterem-se resultados positivos nesse sentido, já que como sabemos este genótipo foi melhorado geneticamente com o intuito de se atingir uma estrutura radicular superior.

4.19. Ajustes estruturais

4.19.1. Parede celular

Sabe-se que o estresse hídrico é responsável por causar alterações na composição química e nas propriedades físicas da parede celular (afetando, por exemplo, a extensibilidade da parede), e tais mudanças podem estar relacionadas a genes que codificam para a enzima S-adenosylmetionina sintetase (INGRAM; BARTELS, 1996). Sob condições normais de ausência de estresse, áreas onde ocorre intensa lignificação costumam apresentar um alto nível de expressão destes genes, portanto a intensa ativação dos mesmos durante o estresse deve ser sinal de lignificação intensa da parede celular (INGRAM; BARTELS, 1996). Durante o estresse hídrico prolongado, a alongação celular é interrompida e então o processo

de lignificação é iniciado, e para BAT 477 este reforço na parede celular das células deve ser um dos principais processos envolvidos na resistência a dessecação já que foram encontradas 13 ESTs codificando para S-adenosylmetionina sintetase.

Outra importante EST encontrada na biblioteca foi a GUCCSH1018E10 que codifica provavelmente para a enzima xyloglucano endotransglucosylase. Esta enzima é capaz de clivar de forma reversível moléculas de xyloglucanos que irão assim influenciar no aumento da extensibilidade na região apical da raiz (WU et al., 1994).

A EST GUCCSH1017E08 codifica para a enzima pectina metilesterase. Em plantas, fungos e bactérias estas enzimas são ubíquas e modificam o grau em que ocorre a metil-esterificação de pectinas que são um dos mais abundantes componentes da parede celular destes organismos. Tais mudanças na estrutura das pectinas esta associada com mudanças na adesão celular, plasticidade, pH e na concentração iônica da parede celular e influenciam não somente como a planta irá se desenvolver, mas também sua adaptação à situação de estresse.

4.19.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática é uma barreira biológica entre os ambientes extra- e intracelular e é essencial para a manutenção da integridade celular (BEMENT et al., 2007). Desta forma, o reparo é uma resposta rápida necessária prevenindo a perda de células importantes, como em neurônios animais, por exemplo, que são insubstituíveis (BEMENT et al., 2007). Pequenos danos, em escala nanométrica, são reparados de forma passiva como resultado de interações termodinâmicas conduzidas por interações entre lipídios. Entretanto, para danos mais severos, na escala de micrômetros, o reparo requererá adições exocitóticas de camadas de membrana interna para a superfície celular (BI; ALDERTON; STEINHARDT, 1995).

Estresses abióticos, principalmente aqueles que levam a alteração no balanço osmótico celular e/ou causam a liberação de compostos reativos tais como as espécies reativas de oxigênio, costumam ser fontes de danos graves, e dependendo

da intensidade de duração do estresse, até mesmo letais a membrana plasmática. Sinaptotagminas constituem uma família de proteínas transportadoras de membrana que são caracterizadas por uma região N-terminal transmembranar, um conector de dimensão variável, e dois domínios C2 (C2A e C2B) C-terminal em tandem (CRAXTON, 2004) (Figura 32).

As sinaptotagminas são conhecidas por sua habilidade de, quando ativadas por íons Ca^{2+} , mediar o transporte de membranas intracelulares para áreas de danos através de um mecanismo que lembra a exocitose neural mediada por Ca^{2+} . Shapire et al (2008), demonstrou que a perda de função induzida ao gene que codifica para esta proteína em *Arabidopsis*, levou a uma redução na viabilidade das células como consequência de uma diminuição na integridade da membrana plasmática. Uma EST (GUCCSH1001C06) similar a uma sinaptotagmina de *Ricinus communis* foi identificada em nossa biblioteca, a Figura 25 auxilia a entender os mecanismos de ação desta proteína.

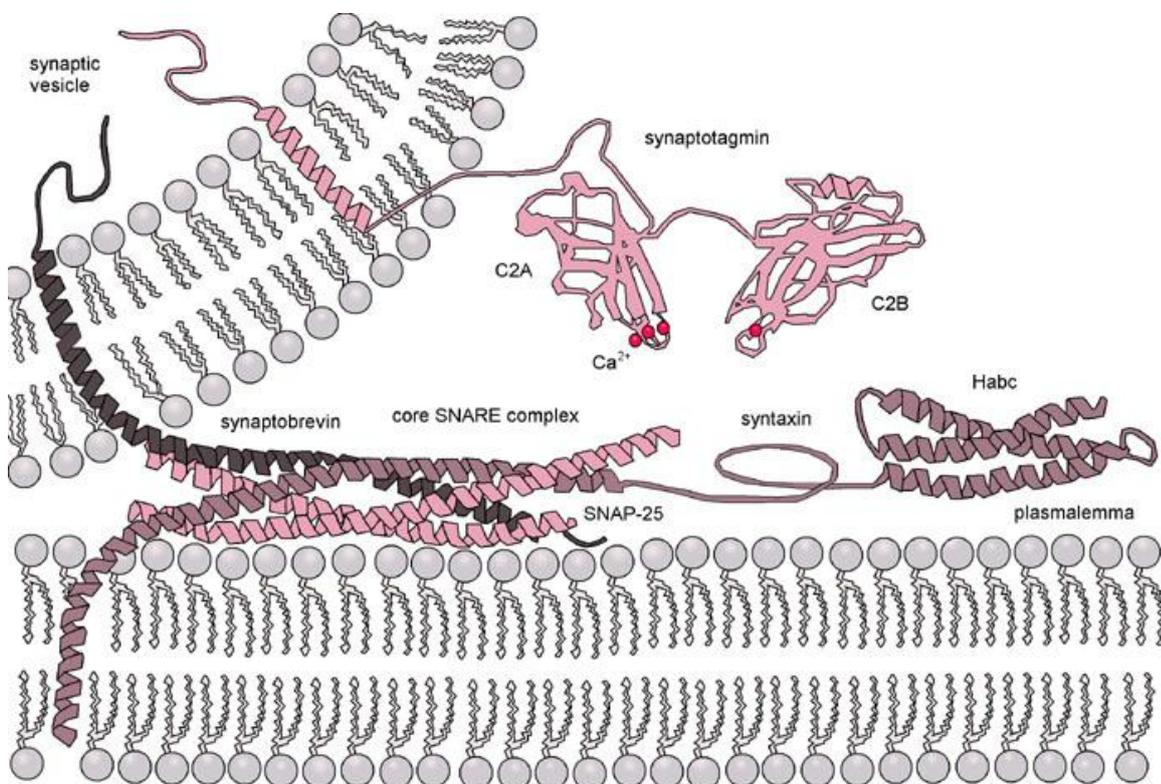


Figura 25 - Mecânismo de ação das sinaptotagminas caracterizadas por uma região N-terminal transmembranar, um conector de dimensão variável, e dois domínios C2 (C2A e C2B) C-terminal em tandem. Quando ativadas por íons Ca^{2+} , mediam o transporte de membranas intracelulares para áreas de danos através de um mecanismo que lembra a exocitose neural mediada por Ca^{2+} . Fonte: adaptado de Craxton (2004)

4.20 Validação da biblioteca subtrativa através de quantificação relativa via RT-qPCR

Devido à alta sensibilidade, especificidade e a grande amplitude de quantificação de até sete ordens de magnitude (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004), a técnica de RT-qPCR é, nos dias de hoje, o método mais acurado e utilizado para se detectar baixas quantidades de mRNA (BUSTIN, 2002). É exatamente devido a este fato que esta técnica se tornou o método mais comumente empregado na validação de bibliotecas de ESTs (GIULIETTI et al., 2001).

O objetivo central de nosso experimento de validação da biblioteca subtrativa de ESTs usando RT-qPCR era responder a duas perguntas cruciais: 1) Os genes encontrados em nossa biblioteca estão realmente envolvidos na resposta diferencial de BAT477, ou seja, eles estão sendo expressos de forma diferencial no momento de tempo amostrado em que a planta estava sob intenso estresse hídrico; e 2) Existe um padrão diferencial de expressão destes genes em relação ao genótipo Carioca 80SH, ou seja, eles são expressos unicamente, ou em maior quantidade no genótipo BAT477.

4.20.1 Seleção dos genes para análise de expressão relativa em RT-qPCR e otimização dos *primers*

Conforme enfatizado anteriormente, era impossível analisar todas as ESTs encontradas em nossa biblioteca, portanto foram selecionados dentro da nossa lista de *contigs* aqueles genes que provavelmente estariam sendo expressos em maior abundância pelo genótipo BAT 477, exatamente por sua frequência de ocorrência (número de cópias formando *clusters*) ser maior na biblioteca e, a partir deste ponto, foram desenhados *primers* para estas sequências.

Ao todo foram sintetizados 19 pares de *primers*, a lista completa, bem como suas especificações encontram-se na Tabela 3. De posse dos *primers*, o passo inicial de nossas análises foi realizar testes para verificar qual a temperatura de anelamento ideal para cada um deles, afim de assim não gerar produtos inespecíficos durante a reação de RT-qPCR. Todos os *primers* foram testados inicialmente com temperatura fixa de anelamento de 55°C, ou seja, temperatura mais baixa possível, o que comprovaria que não importa o aumento de temperatura, os produtos sempre seriam específicos. A Figura 26 exibe o resultado dos testes e como podemos perceber três dos *primers* acabaram exibindo um padrão inespecífico de bandas: *GHRPv1* (*dissimilatory sulfite reductase beta subunit*), *GHRPv10* (*proline-rich protein*) e *GHRPv13* (*late embriogenesis abundant protein*).

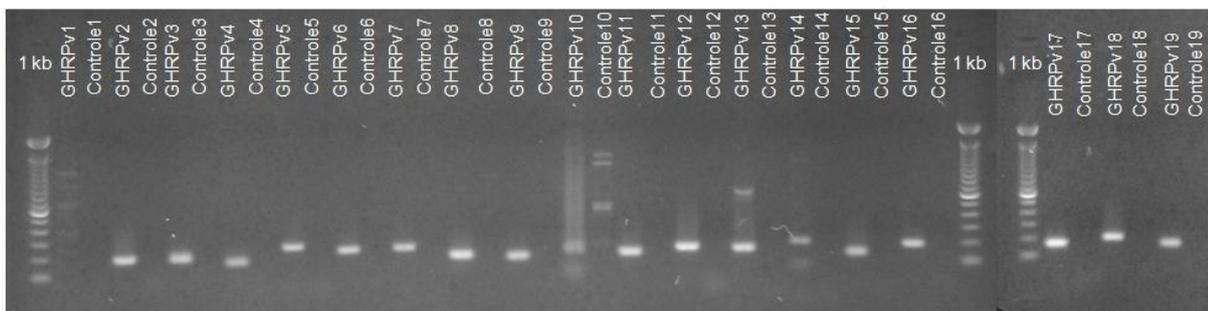


Figura 26 - Gel de agarose 1,7% para o teste de amplificação dos *primers*. Três dos *primers* acabaram exibindo um padrão inespecífico de bandas: *GHRPv1* (*dissimilatory sulfite reductase beta subunit*), *GHRPv10* (*proline-rich protein*) e *GHRPv13* (*late embriogenesis abundant protein*)

Os três pares de *primers* (*GHRPv1*, *GHRPv10* e *GHRPv13*) foram então testados novamente, agora adotando-se um gradiente de temperaturas afim de se estabelecer a melhor temperatura para anelamento (53°C, 53,8°C, 55°C, 56,3°C, 57,3°C, 59,1°C, 61,2°C e 64°C), mas a inespecificidade de produtos continuava presente. Outro teste foi então efetuado, tentando-se a temperatura de anelamento igual à temperatura de *melting*, menos 1°C, porém mesmo nesse caso a inespecificidade dos *primers* permanecia alta, então, como estudos de validação costumam fixar seus testes em análises que compreendem de nove a 14 genes, optamos por descartá-los de nosso experimento.

4.20.2 Preparar das amostras para análise de expressão relativa em RT-qPCR

Como vimos anteriormente, análises de expressão relativa utilizando RT-qPCR requerem normalizadores ou genes de referência (*housekeeping genes*), através dos quais mudanças no padrão de expressão dos genes analisados possam ser medidas. A expressão dos genes de referência utilizados para a normalização dos dados de RT-qPCR devem ser sempre estáveis, não importando a natureza da amostra, ou seja, em nosso caso seriam genótipos e tratamentos distintos; caso contrário poderia acabar acarretando em interpretações errôneas.

Selecionamos para nosso experimento dois genes de referência, os genes *act* (actina) e *skip2*, já testados em outros experimentos em nosso laboratório (Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP, dados ainda não publicados) que envolviam os genótipos BAT 477 e Carioca 80SH, ambos submetidos a tratamentos ‘*com*’ e ‘*sem*’ estresse hídrico, e que em todos os casos haviam apresentado padrões estáveis e uniformes de expressão. Segundo WONG; MEDRANO (2005), a adoção de no mínimo dois genes de referência em cada experimento é necessária, pois o uso de um único gene de referência poderia enviesar falsamente os resultados, além disso, é sempre interessante selecionar genes para referência que se adequem às condições do experimento.

Selecionados os genes de referência e os 16 genes da biblioteca que seriam analisados, foram feitos dois testes, ambos utilizando o gene de referência *act*, para se determinar qual *kit* de reação de RT-qPCR seria mais adequado ao nosso experimento frente à natureza de nossas amostras. Foram testados os *kits* *SensiMixTM SYBR One-Step Kit* e o *MaximaTM First Strand cDNA Synthesis Kit for two step RT-qPCR*. A diferença que levou ao sucesso na reação que emprega o *kit* *MáximaTM* e o fracasso com o *kit* *SensiMixTM* deve estar relacionada provavelmente à natureza da amostra, ou seja, tecido radicular, que tradicionalmente apresenta uma maior concentração de moléculas de RNA estruturais que podem configurar um interferente na reação.

A Figura 27 mostra as curvas de amplificação do gene *act* submetidos aos quatro tratamentos analisados (BAT477 com estresse, BAT477 controle, Carioca 80SH com estresse e Carioca 80SH controle) e nela podemos evidenciar que enquanto para o *kit Máxima*TM todas as curvas apresentaram um padrão médio constante de expressão e mesmo valor médio de Ct (ponto em que a curva de amplificação atinge o *threshold* na fase exponencial e que é determinante no cálculo do número inicial de cópias do gene na amostra), o *kit SensiMix*TM apresentou inconstância no valor médio Ct até mesmo dentro das replicatas.

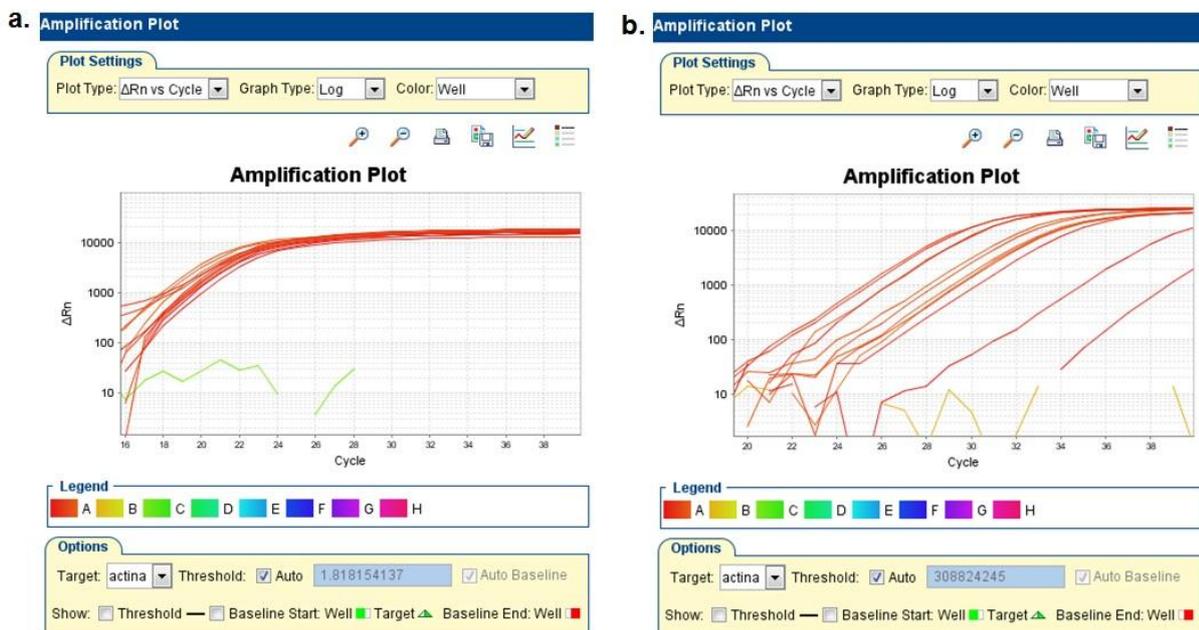


Figura 27 - Curvas de amplificação em escala logarítmica do gene *act* submetido aos quatro tratamentos analisados. Podemos evidenciar que enquanto para o *kit Máxima*TM (a) todas as curvas apresentaram um padrão médio constante de expressão e mesmo valor médio de Ct, o *kit SensiMix*TM (b) apresentou inconstância no valor médio Ct até mesmo dentro das replicatas

Tendo sido selecionada a metodologia e feito o desenho das placas era necessário preparar as amostras para o experimento. Foram extraídos RNA total das quatro amostras necessárias sendo elas: tecido radicular de BAT477 e Carioca 80SH ambas sob estresse hídrico e os controles de ambas as amostras que encontravam-se sob condições normais de irrigação, coletados todos no mesmo momento (dia 16/02/2009). A extração do RNA total foi realizada com sucesso utilizando o reagente Trizol (*Trizol*[®]LS Reagent) e o mesmo protocolo empregado

para as extrações iniciais de RNA total empregado anteriormente, o qual permitiu a obtenção de amostras de RNA total com boa quantidade e qualidade conforme podemos verificar pela Tabela 11. De acordo com a Figura 28, podemos também perceber a pureza das amostras.

Tabela 11 - Quantificação das amostras de BAT 477 obtidas por espectrofotometria

Identificação	Concentração	Unid.	260/280	260/230
bat c/estres 1	963,8	ng/μl	1,9	1,72
bat c/estres 2	732,3	ng/μl	1,95	1,41
bat c/estres 3	729,3	ng/μl	1,93	1,66
bat c/estres 4	671,6	ng/μl	1,94	1,34
bat c/estres 5	724,5	ng/μl	1,93	1,66
bat c/estres 6	698,8	ng/μl	1,93	1,4
bat s/estres 1	410,4	ng/μl	2	0,95
bat s/estres 2	462,4	ng/μl	1,85	0,39
bat s/estres 3	643,3	ng/μl	1,65	0,25
bat s/estres 4	445,5	ng/μl	2,02	0,6
car s/estres 5	491,5	ng/μl	1,96	0,55
car s/estres 6	336,8	ng/μl	2	0,64
car s/estres 7	209,8	ng/μl	1,96	0,77
car s/estres 8	1021,5	ng/μl	2,01	1,46
car c/estres 9	810,6	ng/μl	1,98	0,9
car c/estres 10	552,4	ng/μl	2	0,61
car c/estres 11	399	ng/μl	1,94	0,49
car c/estres 12	467,6	ng/μl	1,99	0,61

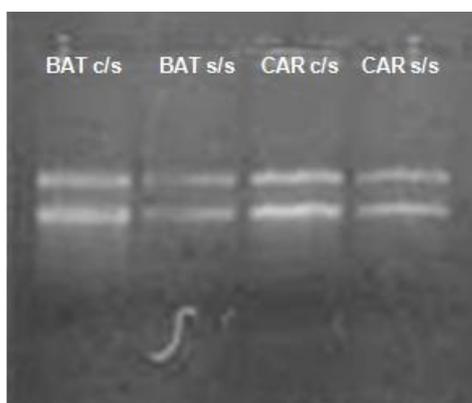


Figura 28 - Gel de agarose 1,6% carregado com amostras de Carioca 80SH para a verificação da qualidade das amostras extraídas

4.20.3 Análise de expressão relativa em RT-qPCR

As análises de expressão relativa em RT-qPCR foram efetuadas em quatro partes, ou seja, foram necessários quatro experimentos para que pudéssemos alocar em cada placa não somente as amostras dos quatro tratamentos, mas também para que cada unidade ‘*tratamento + gene*’ pudesse ter repetições biológicas, que aqui foram feitas na forma de triplicatas. Também foram alocadas em cada placa as triplicatas das amostras de cada tratamento submetidas aos dois genes de referência, *act* e *skip2*, além do branco para cada mistura de reação.

Os resultados das análises de RT-qPCR feitas em *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)* foram acompanhadas e registradas a cada ciclo de amplificação pelo programa *StepOne™ Software v2.0*. Após o final de cada experimento, foram analisadas as curvas de amplificação de cada triplicata para verificar se estas possuíam falhas de amplificação ou diferenças marcantes de valor de Ct que pudessem levar a posteriores dificuldades nas análises estatísticas dos dados. Foram também verificadas as curvas de *melting* para cada triplicata, esta análise sendo um recurso importante para se verificar se houve, dentro da triplicata, amplificação uniforme do gene em questão. Um quadro contendo as curvas de amplificação de cada experimento encontra-se na Figura 28, e um quadro contendo as curvas de *melting* de cada experimento encontra-se na Figura 29.

De posse dos dados de amplificação de todas as triplicatas nas 4 placas, os dados foram então exportados para planilhas de Excel para serem analisados pelo *software* de construção de regressão linear *LinRegPCR (12.x)*, e assim obter os valores de eficiência (E) para cada amostra e também valores de Ct. Com os dados de E e Ct, foi possível realizar todos os cálculos necessários para se chegar ao valor de N_0 , ou seja, a concentração inicial de cada um dos *amplicons* (cópias do gene) em cada amostra. Baseado nesses valores foi possível obter então um valor médio de N_0 para cada uma das triplicatas e assim normalizar os resultados com base no valor de N_0 dos genes de referência de cada placa correspondente à placa em que o gene foi analisado.

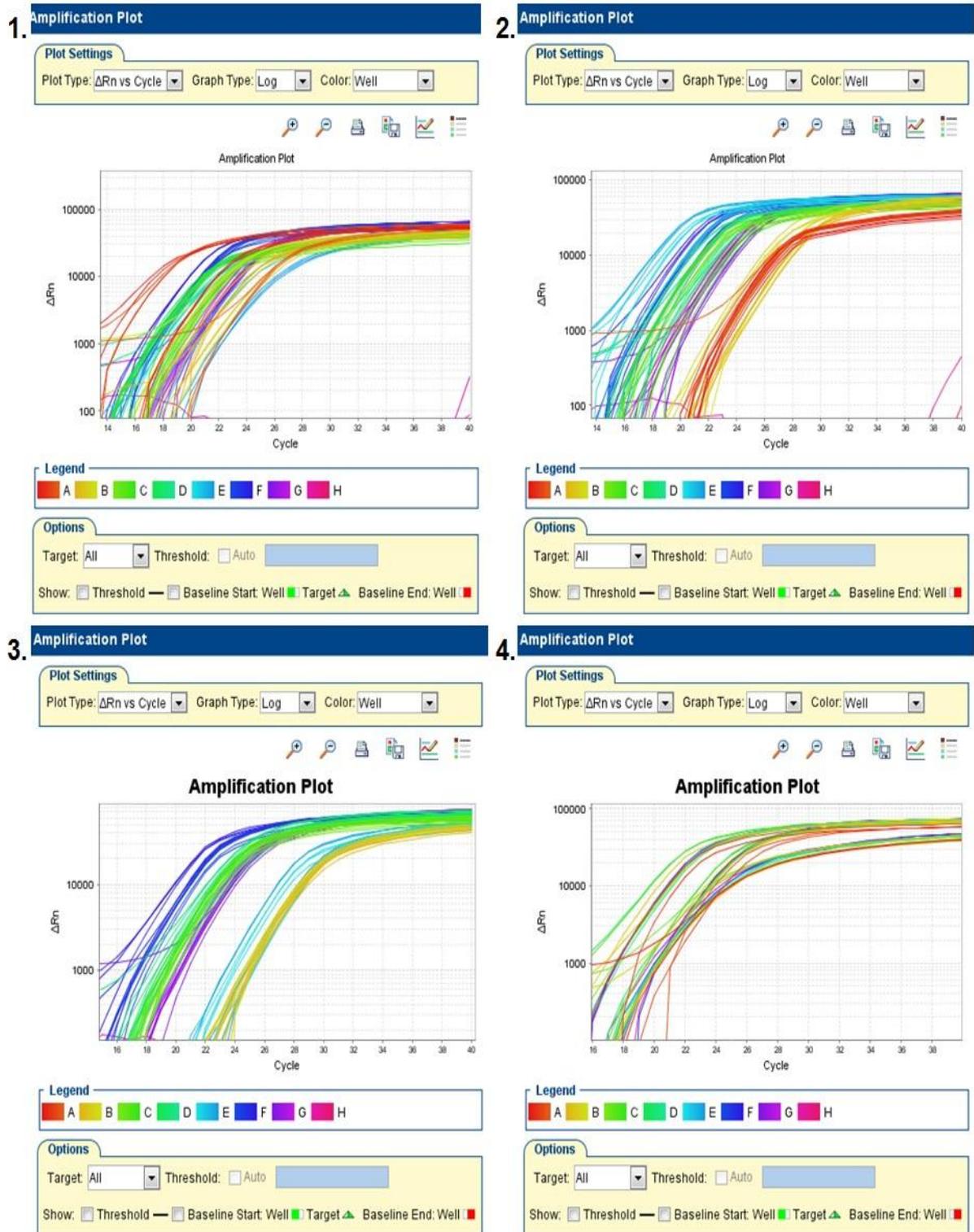


Figura 28 - Curvas de amplificação em escala logarítmica de cada uma das placas de experimento. 1. Placa1; 2. Placa2; 3. Placa3; 4. Placa4

Com os valores de N_0 normalizados foram possíveis os cálculos estatísticos de Expressão Relativa necessários para responder as duas perguntas principais deste experimento. Para responder a pergunta (1) uma razão (expressão relativa) entre o valor de N_0 de cada amostra sob estresse e controle foi calculada ($Ratio = N_0 \text{ da amostra com estresse} / N_0 \text{ do controle}$). Os dados referentes a esta análise encontram-se plotados no gráfico da Figura 30, cujos valores encontram-se na Tabela 12.

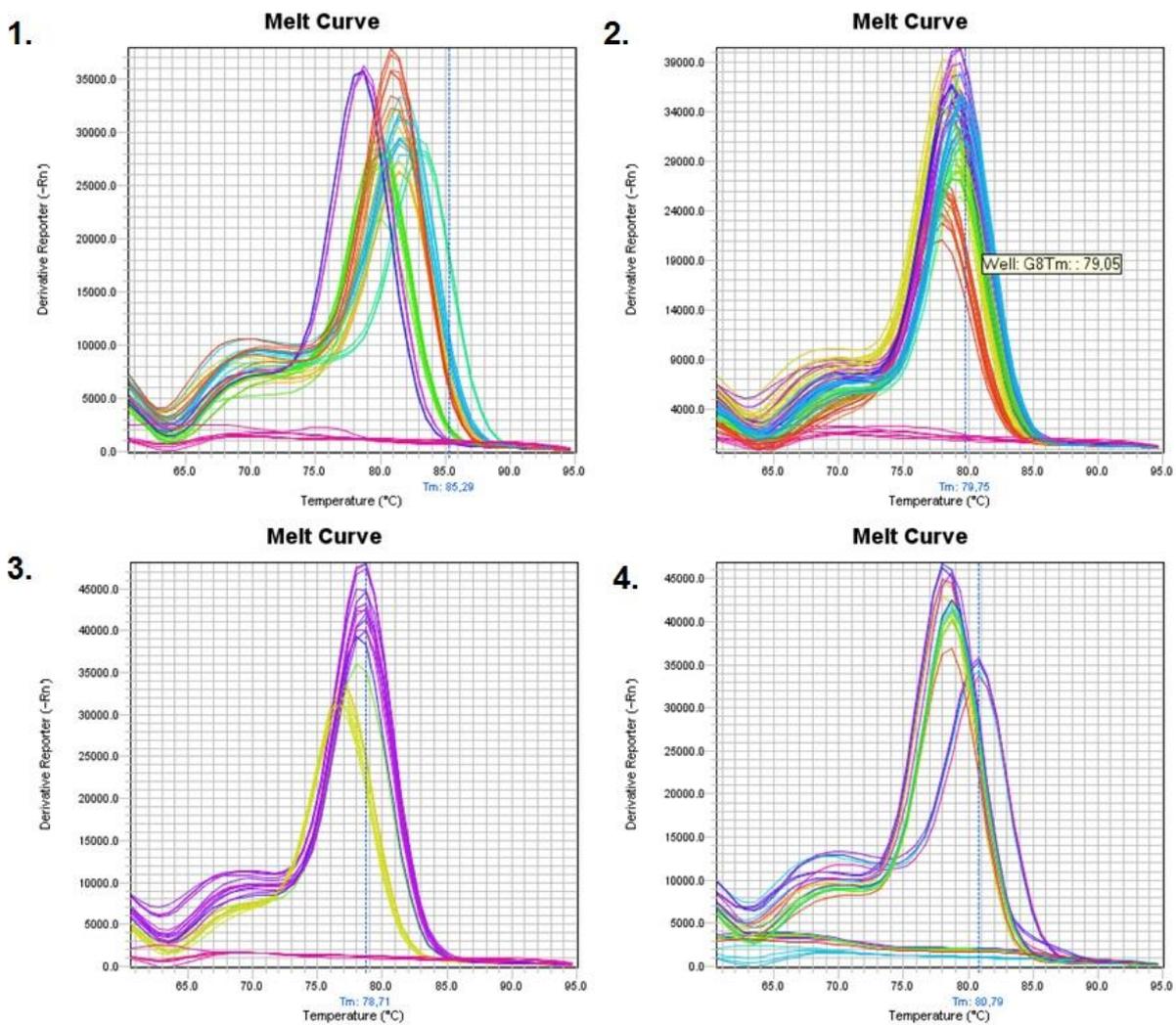


Figura 29 - Curvas de *melting* de cada uma das placas de experimento. 1. Placa1; 2. Placa2; 3. Placa3; 4. Placa4

Tabela 11 - Dados de R médio ($Ratio = N_0$ da amostra com estresse/ N_0 do controle) entre as triplicatas para cada *primer* – b significa BAT sob estresse/ BAT controle, c significa CAR sob estresse/ CAR controle. DP é referente ao desvio padrão

Amostra	R médio	DP
GHRPv 2b	24,61	4,999861
GHRPv 2c	540,95	195,493
GHRPv 3b	0,92	0,15407
GHRPv 3c	0,17	0,038331
GHRPv 4b	1,07	0,267291
GHRPv 4c	0,7	0,175172
GHRPv 5b	1,36	0,619663
GHRPv 5c	1,49	1,719683
GHRPv 6b	5,72	2,040578
GHRPv 6c	33,47	12,6537
GHRPv 7b	2,59	0,287735
GHRPv 7c	0,36	0,049361
GHRPv 8b	4,13	0,523643
GHRPv 8c	4,12	0,565244
GHRPv 9b	8,81	1,830494
GHRPv 9c	9,28	1,230877
GHRPv 11b	0,57	0,206326
GHRPv 11c	1,9	0,728822
GHRPv 12b	25,42	22,77712
GHRPv 12c	55,03	31,57724
GHRPv 15b	1,23	0,418821
GHRPv 15c	1,19	0,491388
GHRPv 16b	0,69	0,173076
GHRPv 16c	0,76	0,101786
GHRPv 17b	0,1	0,031961
GHRPv 17c	0,67	0,161607
GHRPv 18b	0,44	0,056921
GHRPv 18c	0,42	0,096094
GHRPv 19b	2,94	3,843531
GHRPv 19c	1	0,163538

É importante ser feita uma observação em relação aos dados mostrados no Figura 30, antes de analisá-los. Todo esse cálculo é construído em cima de níveis basais de expressão, ou seja, se pegarmos, por exemplo, o padrão de expressão relativa mostrado pelo *primer GHRPv2* referente a um gene que codifica para uma proteína LEA do grupo 5 podemos perceber que o nível de expressão relativa em Carioca 80SH é bem maior que em BAT477, porém se prestarmos atenção, quando sob estresse a expressão de LEA5 em Carioca 80SH pode estar presente e ser estimulada, assim como ocorre em BAT477, porém em Carioca o diferencial é bem maior, pois, enquanto o nível basal de expressão desta proteína em BAT477 poderia ser bem alto e portanto não apresentar grande diferença em questões relativas, em

Carioca ele deve ser bem baixo e portanto representa uma diferença relativa bem grande. Tal observação se comprova quando olhamos para o padrão de expressão relativa deste gene mostrado na Figura 31 e percebemos que quando comparados BAT 477 e Carioca 80SH para este gene, o padrão de expressão relativa em BAT 477 é positivamente superior em BAT 477.

Conforme a Figura 30 o nível de expressão relativa de onze, dos 15 genes testados respondem positivamente a pergunta (1), ou seja, quando sob forte estresse hídrico, estes genes são expressos em maior quantidade em BAT477 (maior concentração de transcritos na célula) do que em condições normais. São eles *GHRPv2*, *GHRPv4*, *GHRPv5*, *GHRPv6*, *GHRPv7*, *GHRPv8*, *GHRPv9*, *GHRPv12*, *GHRPv15*, *GHRPv19*. Quanto aqueles que apresentaram uma expressão relativa negativa, sendo eles *GHRPv3*, *GHRPv11*, *GHRPv17*, *GHRPv16* e *GHRPv18* o motivo não deve estar relacionado à falhas e sim ao fato de que o nível basal destes genes ou não foi alterado, ou mesmo diminuídos frente ao estresse, sendo o motivo infelizmente e provavelmente relacionado ao fato de que bibliotecas subtrativas selecionam de formas aleatórias genes expressos diferencialmente em uma dada amostra, e no caso destes genes, tais genes poderiam estar sim sendo transcritos em maior concentração em BAT 477 do que em Carioca 80SH, porém eles não são relativos à resposta específica diferencial do genótipo ao estresse, mas sim fazerem parte do metabolismo normal da planta, portanto não apresentando grandes diferenças quanto ao controle, ou sendo mesmo reprimidos.

Outro dado interessante que podemos extrair do gráfico na Figura 30 é o padrão de expressão dos genes selecionados no genótipo Carioca 80SH. Com base nesse gráfico, podemos inferir que todos estes genes estão presentes e ativos de certa forma também no genótipo Carioca 80SH, tendo seu padrão de expressão aumentados durante o estresse (*GHRPv2*, *GHRPv5*, *GHRPv6*, *GHRPv8*, *GHRPv9*, *GHRPv11*, *GHRPv12*, *GHRPv15*, e *GHRPv19*) ou mesmo reprimidos (*GHRPv3*, *GHRPv4*, *GHRPv7*, *GHRPv16*, *GHRPv17* e *GHRPv18*). Esta observação nos permite dizer com certeza, que nossa biblioteca subtrativa de cDNA não ofereceu necessariamente genes existentes ou ativos somente no genótipo resistente, e sim genes que estão ativos em maior quantidade (maior número de transcritos) neste genótipo.

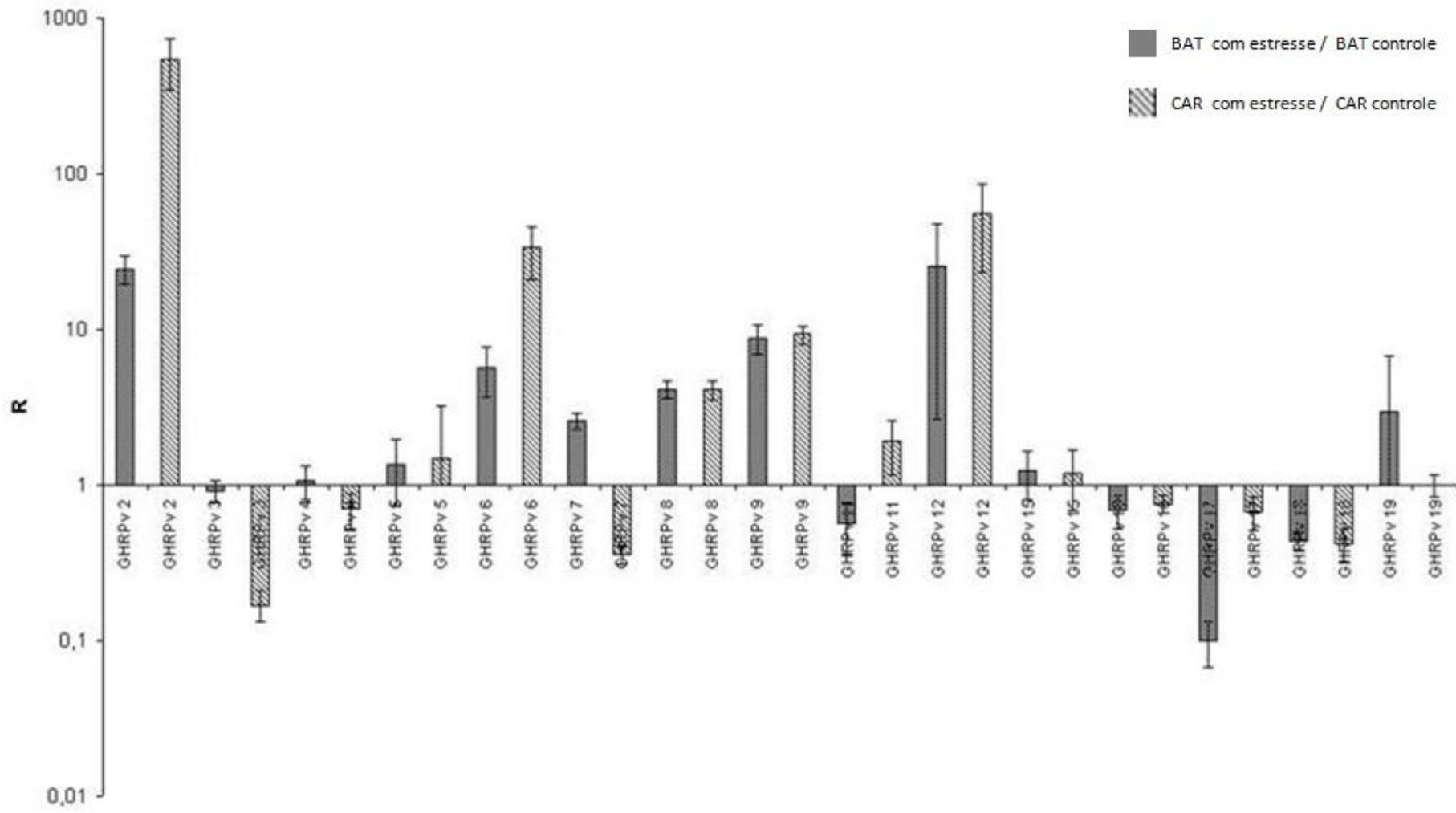


Figura 30 - Gráfico contendo os dados de expressão relativa (R médio) confrontando os tratamentos com seus respectivos controles para cada gene representado pelo respectivo par de *primers*

A partir deste ponto nos resta responder a pergunta (2). Para tanto uma razão (expressão relativa) entre o valor de N_0 de cada amostra sob estresse e entre cada amostra controle foi calculada ($Ratio = N_0$ da amostra BAT com estresse / N_0 da amostra CAR com estresse e $Ratio = N_0$ da amostra BAT controle / N_0 da amostra CAR controle). Os dados referentes a esta análise encontram-se plotados no gráfico da Figura 31, cujos valores encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Dados de R médio ($Ratio = N_0$ de BAT com estresse / N_0 de CAR com estresse e BAT controle / CAR controle) entre as triplicatas para cada *primer* – b significa BAT sob estresse / CAR sob estresse, c significa BAT controle / CAR controle. DP é referente ao desvio padrão

Amostra	R médio	DP
GHRPv 2b	1,96	0,397597
GHRPv 2c	43,02	11,4403
GHRPv 3b	2,27	0,378232
GHRPv 3c	0,61	0,258734
GHRPv 4b	2,32	0,580218
GHRPv 4c	1,52	0,241605
GHRPv 5b	1,2	0,241187
GHRPv 5c	0,59	0,08584
GHRPv 6b	2,87	1,023249
GHRPv 6c	16,78	9,005724
GHRPv 7b	1,2	0,133135
GHRPv 7c	0,16	0,017311
GHRPv 8b	1,04	0,131766
GHRPv 8c	1,04	0,139039
GHRPv 9b	1,57	0,326685
GHRPv 9c	1,66	0,552405
GHRPv 11b	1,04	0,271499
GHRPv 11c	2,83	0,737293
GHRPv 12b	1,13	0,016788
GHRPv 12c	2,46	0,361513
GHRPv 15b	1,19	0,381024
GHRPv 15c	0,22	0,089242
GHRPv 16b	5,16	1,208243
GHRPv 16c	0,33	0,044791
GHRPv 17b	5,65	0,834693
GHRPv 17c	0,05	0,011616
GHRPv 18b	5,52	1,762336
GHRPv 18c	0,16	0,037421
GHRPv 19b	2,01	2,622055
GHRPv 19c	0,72	0,020822

Sobre o gráfico na Figura 31, pode-se inferir que ele confirma que na situação de estresse, todos os genes analisados expressam-se de forma superior no genótipo BAT 477, ou seja, a presença destes transcritos era maior na situação amostrada para BAT 477 em detrimento de Carioca 80SH, validando de forma positiva nossa biblioteca. Quanto aos controles estes dados sinalizam que alguns dos genes estudados encontram-se, quando em situação normal de irrigação, com expressão relativamente maior em BAT 477 (*GHRPv2*, *GHRPv4*, *GHRPv6*, *GHRPv8*, *GHRPv9*, *GHRPv11* e *GHRPv12*) e de forma curiosa, relativamente maior em Carioca 80SH (*GHRPv3*, *GHRPv5*, *GHRPv7*, *GHRPv15*, *GHRPv16*, *GHRPv17*, *GHRPv18* e *GHRPv19*), lembrando é claro que estes dados estão profundamente relacionados ao nível basal de expressão destes genes em situação de ausência de estresse.

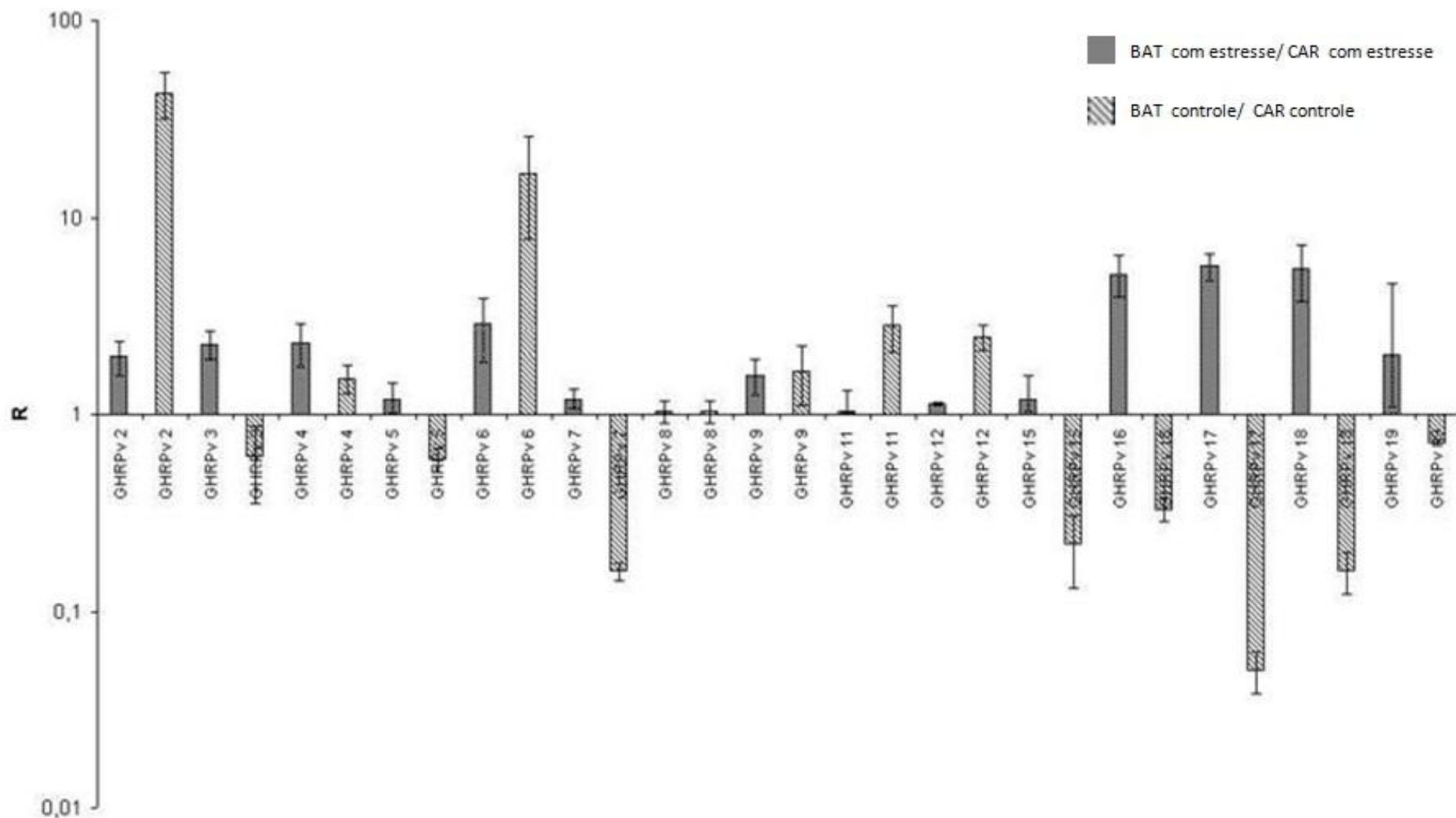


Figura 31 - Gráfico contendo os dados de expressão relativa (R médio) confrontando os tratamentos os sob estresse e seus respectivos controles para cada gene representado pelo respectivo par de *primers*

5 CONCLUSÃO

Os estresses abióticos, de uma forma geral, são permanentes na natureza e como vimos podem diminuir substancialmente a produção agrícola. A resposta das plantas a estas pressões ambientais adversas configura-se como parte importante dos mecanismos que permitem a elas sobreviverem ao estresse. Como vimos a resposta dependerá da severidade e duração do estresse, do estágio fenológico em que a planta se encontra, do tipo de tecido, e das interações entre múltiplos estresses, sendo que estas respostas podem permitir que um organismo evite ou tolere o estresse. As mudanças de expressão gênica podem estar tanto envolvidas no mecanismo de resistência ao estresse como podem ser resultado de danos celulares sofridos pela planta.

Vários objetivos foram alcançados com sucesso em nosso trabalho. Primeiramente, foi possível, graças ao sucesso no emprego da técnica de construção da bibliotecas de SSH, a obtenção de 1572 *reads* válidos, sendo que pudemos até o momento conferir função, mesmo que putativa, a 896 deles. Estas ESTs encontram-se devidamente anotadas, agrupadas dentro de suas respectivas classes funcionais e armazenadas em banco de dados aguardando validação para serem compartilhadas em bancos de dados públicos.

O índice de novidade da biblioteca de SSH, calculado em relação ao número de novos *singletons* incorporados à coleção de ESTs, encontra-se ainda alto (75,57%), ou seja, mais reações de sequenciamento ainda poderiam ser realizadas até se atingir um ponto de saturação que represente um padrão, baseado em frequência, mais representativo da realidade do perfil de expressão gênica de BAT 477 sob estresse.

Uma análise mais apurada acerca dos possíveis processos biológicos em que algumas das ESTs de nossa biblioteca possam estar envolvidas nos permitiu até o momento identificar diversas vias de sinalização metabólicas ativas em BAT 477. Estas vias devem estar envolvidas em eventos de sinalização em cascata que levam a ativação de diversos fatores de transcrição e a conseqüente expressão de genes

importantes para o processo de resistência da planta ao estresse hídrico. Vias de sinalização são redes complexas e não rotas de sentido único, neste sentido, as ESTs por nós identificadas, e também aquelas ainda sem uma função putativa definida, necessitarão de mais esforços futuros para que possamos vir a obter mais peças para se construir um mapa metabólico completo e representativo da resposta diferencial de BAT 477 sob o efeito da privação de água.

Os experimentos de análise da expressão relativa por RT-qPCR de alguns dos genes mais abundantes em nossa biblioteca serviram não somente para validar a hipótese de que os genes subtraídos realmente estão sendo mais expressos no genótipo resistente do que no suscetível (comprovando o sucesso do experimento de construção da biblioteca subtrativa), mas também ofereceram dados importantes que nos levam a crer que tais mecanismos gênicos não são exclusivos de BAT 477. As análises estatísticas confirmaram que tais genes também estão presentes em Carioca 80SH, porém encontra-se com níveis de expressão basal muito baixos, ou mesmo, reprimidos. Entender, portanto quais fatores levam a repressão da expressão destes genes em Carioca 80SH pode ser o ponto chave para se desenvolver estratégias para o melhoramento da resistência deste genótipo frente ao estresse.

Um fator interessante mostrado pela análise de RT-qPCR é que diversos dos genes responsivos à seca usados para a validação da biblioteca, também estavam ativos nas amostras de Carioca 80SH sobre estresse. Este resultado nos permite dizer que a classificação feita por alguns pesquisadores de que este genótipo seja moderadamente resistente à seca não seja algo completamente errado. O experimento comprova que de certa forma a resposta existe, porém em menor intensidade, portanto talvez se sanada a condição de estresse ao longo do tempo, pode ser que seja garantida a sobrevivência da planta.

Embora muitas respostas tenham sido encontradas, muitas novas questões ainda permanecem em aberto, como qual o papel das demais 676 ESTs válidas, e ainda não classificadas na resposta de BAT 477 ao estresse, qual a função destes genes, ou mesmo, dentro das 896 sequências com função estabelecidas, qual o papel real de cada uma delas frente o estresse. E quanto aos demais dias onde as

plantas ficaram sujeitas ao estresse, quais foram os mecanismos de respostas ativados e desativados até as plantas atingirem o PMP, pergunta estas que esperamos responder nos próximos meses.

Sem dúvida estas, e muitas outras questões, permanecerão em aberto e poderão se tornar importantes pontos de partida para estudos futuros, porém no momento podemos com certeza afirmar que realmente, BAT 477 possui sim um grande aparato gênico, que faz dele um genótipo resistente ao estresse hídrico e o fato de Carioca 80SH também expressar alguns destes genes como provou nosso experimento de validação usando a técnica de RT-qPCR, nos dá um excelente ponto de partida para buscar por alternativas que nos possibilitem desenvolver estratégias para o melhoramento genético não somente desta, mas também de tantas outras cultivares de feijoeiro comumente cultivados sob situações de déficit hídrico. Além disso, a validação e publicação das ESTs de nossa biblioteca gerarão importante base de dados para estudos futuros de expressão gênica em plantas sob efeito de estresses abióticos.

REFERÊNCIAS

- AIDA, M. et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. **Plant Cell**, Baltimore, v. 9, n. 6, p. 841-857, 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMORIN NETO, M. S. Índice de estresse hídrico da cultura do feijoeiro irrigado. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 4, n. 1, p. 49-53, 1996.
- ATANASSOVA, R. et al. Sugar regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 326-334, 2003.
- BARBANO, M. T. et al. Probabilidade de atendimento das necessidades hídricas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca), na semeadura das águas, no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 12, n. 2, p. 323-332, 2004.
- BEEBE, S.; MacCLAFFERTY, B. **Biofortified beans**. Washington, DC: Harvest Plus. Breeding Crops for Better Nutrition, 2006. Disponível em: <www.dfid.gov.uk/r4d/PDF/Outputs/Misc_Crop/beans.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2010.
- BEEBE, S. et al. Breeding for abiotic stress tolerance in common bean: present and future challenges. Cali: CIAT, 2009. 72 p. Disponível em: http://km.fao.org/gipb/images/pdf_files/LiteratureViews/Beebe_PPT_apb09.pdf.
- BEMENT, W. et al. Rehabilitation and the single cell. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 19, p. 95–100, 2007.
- BI, G.; ALDERTON, J.; STEINHARDT, R. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 131, p. 1747–1758, 1995.
- BOHNERT, H. J. et al. A genomics approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, p. 295-311, 2001.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 55–128, 2003.
- BRAY, E. A.; BALLEY-SERRES, J.; WERETILNIK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEN, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 22, p. 1158-1203.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 29, p. 23-29, 2002.

CASTELLANOS, J. Z.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A. ¹⁵N-determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under drought stress. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 126, p. 327-333, 1996.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Annual Report 1975**. Cali: CIAT, 1975. p. C14-C24.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Annual Report 1983**. Cali: CIAT, 1983. p. C47-C67.

CHAKRABORTY, U.; SARKAR, B.; CHAKRABORTY, B. N. Protection of soybean root rot by *Bradirhizobium japonicum* and *Trichoderma harzianum* associated changes in enzyme activities and phytoalexin production. **Journal of Micology Plant Pathology**, Ghaziabad, India, v. 33, p. 21-25, 2003.

CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHEN, M. et al. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, p. 299-305, 2007.

CHEON, C. et al. Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 4125-4135, 1993.

CLEMENT, M. et al. Isolation of a novel nodulin: a molecular marker of osmotic stress in *Glycine max* / *Bradyrhizobium japonicum* nodule. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 29, p. 1841-1852, 2006.

CLIFFORF, S. C. et al. Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (*Rhamnaceae*): localization, composition and physiological roles during drought-stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, n. 131-138, 2002.

COLMENERO-FLORES, J. M. et al. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant protein. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 393-405, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Produção brasileira de feijão. Brasília, DF: CONAB. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. Acesso em: 11 jan. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra de Feijão 2010/11. Brasília, DF: CONAB. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. Acesso em: 08 jan. 2011.

CRAXTON, M. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. **BMC Genomics**, London, v. 5, p. 43, 2004.

DAVIS, K. R. et al. Host-pathogen interactions. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 80, p. 568–577, 1986.

DEBOUCK, D. G. Systematic sans morphology. In: van SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common bean, research for crop improvement**. Wallingford: CABI Publishing, 1991, p. 55-118.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 215-223, 1993.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

DODD, A. N.; KUDLA, J.; SANDERS, D. The Language of Calcium Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 593-620, 2010.

DUKE, J. A. **Handbook of legumes of world economic importance**. New York: Plenum Press, 1981. 345 p.

DURE III, L. Structural motifs in Lea proteins. In: CLOSE, T. J.; BRAY, E. A. (Ed.). **Plant responses to cellular dehydration during environmental stress**. Rockville: America Society of Plant Physiology, 1993. p. 91-103.

EMBRAPA. O Portal da Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

FARÍAS-RODRÍGUEZ, R. et al. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 102, p. 353-359, 1998.

FINKELSTEIN, R. R.; GAMPALA, S. S.; ROCK, C. D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 15-45, 2002.

FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, Washington, DC, v. 269, p. 496-512, 1995.

FAO. **Global Forest Resources Assessment 2005**: Progress towards sustainable forest management. Rome, 2005. (FAO Forestry Paper, 147).

FRANKEL, N. et al. Adaptative evolution of the water-stress induced gene *Asr2* in *Lycopersicum* species dwelling in arid habitats. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 12, p. 1955-1962, 2003.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1445-1454, 2004.

GARAY-ARROYO, A. et al. highly hydrophilic proteins in prokariotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 8, p. 5668-5674, 2000.

GARCIA, A.; ANDRÉ, R. G. B. Eficiência do uso da água em uma cultura de feijão submetida a duas condições de disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São Paulo, v. 17, n.1, p. 93-102, 2002.

GIULIETTI, A. et al. Na overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods: Companion to Methods in Enzymology**, Orlando, v. 25, p. 386-401, 2001.

GRAHAN, P. H.; RANALLI, P. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, p.131-146, 1997.

GRAHAN, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 872-877, 2003.

GROVER, A. et al. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspectives. **Plant Science**, Amsterdam, v. 143, p. 101-111, 1999.

GOLDSTEIN, G.; NOBEL, P. S. Changes in osmotic pressure and mucilage during low-temperature acclimation of *Opuntia ficus-indica*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 954-961, 1991.

HARA, M. et al. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 290-298, 2003.

HARA, M.; FUJINAGA, M.; KUBOI, T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 657-662, 2004.

HARA, M. et al. DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 32, p. 532-541, 2009.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 3, n. 3, p. 105-111, 2003.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIGUSHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, London, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HSIAO, T. C. Measurements of plant water status. In: STEWART, B. A.; NIELSEN, D. R. (Ed.). **Irrigation of agricultural crops**. New York: ASA, 1990. p. 244-280.

HU, H. et al. Overexpressing a NAM, ATAF and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 35, p. 12987-12992, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 868-877, 1999.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

JAIN, M. et al. The auxin-responsive *GH3* gene family in rice (*Oryza sativa*). **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 6, p. 36-46, 2006.

JEBARA, M. et al. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under P deficiency. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 309-315, 2005.

JINYOU, D. et al. Osmoregulation mechanism of drought stress and genetic engineering strategies for improving drought resistance in plants. **Forestry Studies in China**, Heidelberg, v. 6, n. 2, p. 56-62, 2004.

KARP, P. D. et al. EcoCyc: encyclopedia of *Escherichia coli* genes and metabolism. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, n. 1, p. 55-58, 1999.

KASUGA, M. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 287-291, 1999.

KIPE-NOLT, J.; GILLER, K. A field evaluation using ¹⁵N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, p. 134-178, 1993.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 262-267, 2001.

LI, W.-X. et al. The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 2238-2251, 2008.

LONG, S. R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 69-72, 2001.

LYNCH, J.; WHITE, J. W. Shoot nitrogen dynamics in tropical common bean. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 392-397, 1992.

MAUREL, C. et al. The vacuolar membrane protein - TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 12, p. 2241-2247, 1993.

MIKLAS, P. N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, p. 105-131, 2006.

MONTALVO-HENÁNDEZ, L. et al. Differential accumulation of mRNAs in drought-tolerant and susceptible common bean cultivars in response to water deficit. **New Phytologist**, London, v. 177, p. 102-113, 2008.

MORSE, S. R. Water balance in *Hemizonia luzulifolia*: the role of extracellular polysaccharides. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 13, p. 39-48, 1990.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Phaseolus vulgaris – EST Results. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest?term=phaseolus%20vulgaris>>. Acesso em: 26 fev. 2011.

NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas - Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 23, p. 12-18, 2001.

NEVES, S. R.; RAM, P. T.; IYENGAR, R. G Proteins Pathways. **Science**, Washington, DC, v. 296, n. 5573, p. 1636-1639, 2002.

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, p. 29-34, 1999.

OLIVEIRA, I. C.; CORUZZI, G. M. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 301-310, 1999.

OWTTRIM, G. W. RNA helicases and abiotic stress. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, n. 11, p. 3220-3230, 2006.

PAUL, M. J. et al. Trehalose Metabolism and Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 417-441, 2008.

PENG, Y. et al. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, Berlin, v. 226, p. 729-240, 2007.

PIMENTEL, C. et al. Estresse hídrico em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em simbiose com o *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Turrialba**, Turrialba, v. 40, p. 520-526, 1990.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M.; RICARDO, C. P. P. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. In: SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H. (Ed.). **Plant**

responses to water deficits - from cell to community. Oxford: BIOS Scientific Publisher, 2001. p. 237-251.

PROCÓPIO, S. O. et al. Ponto de murcha permanente de soja, feijão e plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 35-41, 2004.

REECE, J.; CAMPBELL, N. G. protein signaling. In: CAMPBELL, N.; REECE, J. **Biology**. 6. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2002. p. 26-27.

RAMÍREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 99, p. 127-136, 1998.

RHODES, D. Proline, ornithine and arginine metabolism. Alternative pathways of proline synthesis in plants. West Lafayette, Rhodes, 2009. (HORT640 - Metabolic Plant Physiology). Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/proline/pr00006.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

RIBAUT, J. M.; BANZIGER, M.; HOISINGTON, D. Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example. In: IWANAGA, M. (Ed.). **Genetic engineering of crop plants for abiotic stress**. Ibaraki, Japan: JIRCAS, 2002. p. 85-92. (JIRCAS Working Report Series, 23).

RIECHMANN, J. L. et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, Washington, DC, v. 290, p. 2105-2110, 2000.

RILEY, M. Genes and proteins of *Escherichia coli* K-12 (GenProtEC). **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 1, p. 26-54, 1998.

RISON, S. C. G.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 1, p. 56-69, 2000.

RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E.; BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. **Biotechnologia Aplicada**, La Habana, v. 22, p. 1-10, 2005.

RODIGUEZ-URIBE, L.; O'CONNELL, M. A. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1391-1398, 2006.

SACCARDY, K. et al. Photochemical efficiency of Photosystem II and xanthophyll cycle components in *Zea mays* leaves exposed to water stress and high lights. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 57-66, 1998.

SCHLUEPMANN, H. et al. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the USA, Washington, DC, v. 100, n. 11, p. 6849-6854, 2003.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 61-72, 2001.

SELKOV, E. J. et al. MPW: the Metabolic Pathways Database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 26, p. 43-45, 1998.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.; PURCELL, L. SymbioticN₂ fixation response to drought. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 50, p. 143–155, 1999.

SERRANO, R. et al. Salt stress proteins indentified by a functional approach in yeast. **Monatshefte fur Chemie**, Wien, v. 134, p. 1445-1464, 2003.

SHAPIRE, A. L. et al. Arabidopsis Synaptotagmin 1 Is Required for the Maintenance of Plasma Membrane Integrity and Cell Viability. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 3374–3388, 2008.

SHNEIDER, K. A.; BROTHERS, M. E.; KELLY, J. D. Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 51-60, 1997.

SINGH, S. P.; MUÑOZ, C. G. Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and improvement. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 80-89, 1999.

SOUER, E. et al. The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. **Cell**, Cambridge, v. 85, p. 159-170, 1996.

SOUZA, R. P. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 45-56, 2004.

SPONCHIADO, B. N. et al. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. **Experimental Agriculture**, London, v. 25, p. 249-257, 1989.

SUNKAR, R.; BARTELS, D.; KIRCH, H. H. Overexpression of a stress-inducible dehydrogenase gene from *Aarabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 452-464, 2003.

TANG, C. et al. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 260, p. 59-68, 2004.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Comparison of Sources and Lines Selected for Drought Resistance in Common Bean. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 64-70, 2002.

TELLES, G. P.; SILVA, F. R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 17-23, 2001.

THE NOBEL FOUNDATION. **The Nobel Prize in Chemistry 2003**, Peter Agre and Roderick MacKinnon. Stockholm, 2003. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/public.html>. Acesso em: 03 jan. 2011.

TORRES, G. A. M. et al. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. **Plant Science**, Amsterdam, v. 171, p. 300-307, 2006.

van SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm**. Cali: CIAT, 1987. 53 p.

van SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. **Common beans: Research for crop improvement**. Cali: CABI, 1991. p. 679-706.

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

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. **Structure and function analysis of the protein degradation machinery**. Hamerkaz, Israel, 2010. Disponível em: <http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/MichalSharon/>. Acesso em: 18 fev. 2011.

WHITE, J. W.; CASTILLO, J. A. Evaluation of diverse shoot genotypes on selected root genotypes of common bean under soil water deficits. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 762-765, 1992.

WHITING, S. N.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. Applying a solute transfer model to phytoextraction: Zinc acquisition by *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 248, p. 45-56, 2003.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, Natick, v. 39, p. 75-85, 2005.

WU, Y. et al. Root growth maintenance at low water potentials (increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid). **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 607-615, 1994.

XIE, Q. et al. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin downstream of TIR1 to promote lateral root development. **Genes and Development**, New York, v. 14, p. 3024-3036, 2000.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and Genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 25, n. 1, p. 131-139, 2002.

YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K. et al. Biological mechanisms of drought stress response. In: IWANAGA, M. (Ed.). **Genetic engineering of crop plants for abiotic stress**. Ibaraki, Japan: JIRCAS, 2002. p. 1-8. (JIRCAS Working Report Series, 23).

YUEN, J. W. F. Activation of STAT3 by specific G[alpha] subunits and multiple G[beta][gamma] dimers. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 42, n. 6, p. 1052-1059, 2010.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 63, p. 968–989, 1999.

ZHAO, Z.; CHEN, G.; ZHANG, C. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 10, p. 1055-1061, 2001.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 16, p. 253-277, 1997.

ZIMMERMANN, U. et al. High molecular weight organic compounds in the xylem sap of mangroves: implications for long-distance water-transport. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 107, p. 218–229, 1994.

ANEXOS

Anexo A: Dados de Pu (peso úmido), Ps (peso seco), Pa (peso água), Psr (peso seco real) referentes às coletas realizadas durante o experimento de estresse hídrico.

Tabela A.1: Coleta de solo (10/02/2009). Dados de Pu (peso úmido), Ps (peso seco), Pa (peso água), Psr (peso seco real).

	Amostra	Pu	Os	P placa	Psr	Pa	Umidade %	U média
E S T R E S S E	Bat 477 -1	139,48	134	113,58	20,42	5,48	26,8	25,06
	Bat 477 -2	144,03	138,77	122,09	16,68	5,26	31,5	
	Bat 477 -3	149,1	142,6	111,98	30,62	6,5	21,2	
	Bat 477 -4	153,17	147,35	119,29	28,06	5,82	20,7	
	Bat 477 -5	160,4	152,25	119,65	32,6	8,15	25,0	
C O N T R O L E	Bat 477 -6	90,11	84,98	63,08	21,9	5,13	23,4	26,25
	Bat 477 -7	67,43	61,92	42,1	19,82	5,51	27,8	
	Bat 477 -8	86,74	80,94	61,08	19,86	5,8	29,2	
	Bat 477 -9	68,27	64,2	50,58	13,62	4,07	29,8	
	Bat 477 -10	146,39	141,28	116,93	24,35	5,11	20,9	
E S T R E S S E	Carioca – 1	98,22	90,92	57,58	33,34	7,3	21,8	25,92
	Carioca – 2	90,8	84,67	55,52	29,15	6,13	21,0	
	Carioca – 3	137,35	133	115,85	17,15	4,35	25,3	
	Carioca – 4	63,51	59,2	43,82	15,38	4,31	28,0	
	Carioca – 5	62,75	57,84	43,1	14,74	4,91	33,3	
C O N T R O L E	Carioca – 6	136,67	131,69	116,54	15,15	4,98	32,8	31,67
	Carioca – 7	68,79	61,53	38,15	23,38	7,26	31,0	
	Carioca – 8	57,09	52,27	35,91	16,36	4,82	29,4	
	Carioca – 9	67,58	63,78	52,56	11,22	3,8	33,8	
	Carioca – 10	54,9	50,82	37,7	13,12	4,08	31,0	

Tabela A.2: Coleta de solo (13/02/2009). Dados de Pu (peso úmido), Ps (peso seco), Pa (peso água), Psr (peso seco real).

	Amostra	Pu	Ps	P plca	Psr	Pa	Umida de %	U média
E S T R E S S E	Bat 477 -1	153,29	147,27	113,58	33,69	6,02	17,8	20,67
	Bat 477 -2	146,28	142,43	122,09	20,34	3,85	18,9	
	Bat 477 -3	129,5	126,46	111,98	14,48	3,04	20,9	
	Bat 477 -4	131,75	129,39	119,29	10,1	2,36	23,3	
	Bat 477 -5	134,72	131,98	119,65	12,33	2,74	22,2	
C O N T R O L E	Bat 477 -6	74,69	72,52	63,08	9,44	2,17	22,9	20,88
	Bat 477 -7	59,01	57,8	42,1	15,7	1,21	7,7	
	Bat 477 -8	84,66	81,11	61,08	20,03	3,55	17,7	
	Bat 477 -9	70,87	67,02	50,58	16,44	3,85	23,4	
	Bat 477 -10	137,96	134,57	116,93	17,64	3,39	19,2	
E S T R E S S E	Carioca - 1	82,59	78,62	57,58	21,04	3,97	18,8	22,56
	Carioca - 2	67,08	65,2	55,52	9,68	1,88	19,4	
	Carioca - 3	123,37	121,98	115,85	6,13	1,39	22,6	
	Carioca - 4	49,66	48,47	43,82	4,65	1,19	25,5	
	Carioca - 5	52,09	50,22	43,1	7,12	1,87	26,2	
C O N T R O L E	Carioca - 6	131,3	127,8	116,54	11,26	3,5	31,0	27,55
	Carioca - 7	54,11	50,54	38,15	12,39	3,57	28,8	
	Carioca - 8	53,37	49,93	35,91	14,02	3,44	24,5	
	Carioca - 9	64,92	62,26	52,56	9,7	2,66	27,4	
	Carioca - 10	49,8	47,31	37,7	9,61	2,49	25,9	

Tabela A.3: Coleta de solo (16/02/2009). Dados de Pu (peso úmido), Ps (peso seco), Pa (peso água), Psr (peso seco real).

	Amostra	Pu	Ps	P plca	Psr	Pa	Umida de %	U média
E S T R E S S E	Bat 477 -1	136,16	134,63	113,58	21,05	1,53	7,2	8,83
	Bat 477 -2	144,72	142,59	122,09	20,5	2,13	10,3	
	Bat 477 -3	138,27	136,15	111,98	24,17	2,12	8,7	
	Bat 477 -4	144,66	142,77	119,29	23,48	1,89	8,0	
	Bat 477 -5	147,73	145,25	119,65	25,6	2,48	9,6	
C O N T R O L E	Bat 477 -6	87,46	84,66	63,08	21,58	2,8	12,9	13,22
	Bat 477 -7	63,98	61,27	42,1	19,17	2,71	14,1	
	Bat 477 -8	80,86	78,65	61,08	17,57	2,21	12,5	
	Bat 477 -9	77,64	74,09	50,58	23,51	3,55	15,0	
	Bat 477 -10	151,17	147,69	116,93	30,76	3,48	11,3	
E S T R E S S E	Carioca - 1	96,47	93,54	57,58	35,96	2,93	8,1	9,07
	Carioca - 2	90,98	88,39	55,52	32,87	2,59	7,8	
	Carioca - 3	142,81	140,71	115,85	24,86	2,1	8,4	
	Carioca - 4	85,82	82,58	43,82	38,76	3,24	8,3	
	Carioca - 5	96,13	90,22	43,1	47,12	5,91	12,5	
C O N T R O L E	Carioca - 6	164,48	155,51	116,54	38,97	8,97	23,0	27,99
	Carioca - 7	85,25	68,62	38,15	30,47	16,63	54,5	
	Carioca - 8	67,76	62,4	35,91	26,49	5,36	20,2	
	Carioca - 9	88,55	82,15	52,56	29,59	6,4	21,6	
	Carioca - 10	74,17	67,96	37,7	30,26	6,21	20,5	

Tabela A.4: Coleta de solo (18/02/2009). Dados de Pu (peso úmido), Ps (peso seco), Pa (peso água), Psr (peso seco real).

	Amostra	Pu	Ps	P plca	Psr	Pa	Umida de %	U média
ESTRÉSSE	Bat 477 -1	147,09	145,09	113,58	31,51	2	6,3	6,04
	Bat 477 -2	168,05	165,04	122,09	42,95	3,01	7,0	
	Bat 477 -3	161,08	158,64	111,98	46,66	2,44	5,2	
	Bat 477 -4	171,42	168,77	119,29	49,48	2,65	5,3	
	Bat 477 -5	169,26	165,52	119,65	45,87	3,74	8,1	
CONTROLE	Bat 477 -6	104,35	100,32	63,08	37,24	4,03	10,8	10,45
	Bat 477 -7	82,68	78,72	42,1	36,62	3,96	10,8	
	Bat 477 -8	106,32	102,18	61,08	41,1	4,14	10,0	
	Bat 477 -9	99,72	95,38	50,58	44,8	4,34	9,6	
	Bat 477 -10	158,4	154,33	116,93	37,4	4,07	10,8	
ESTRÉSSE	Carioca - 1	107,03	104,35	57,58	46,77	2,68	5,7	6,54
	Carioca - 2	105,37	102,41	55,52	46,89	2,96	6,3	
	Carioca - 3	167,07	163,67	115,85	47,82	3,4	7,1	
	Carioca - 4	95,34	92,32	43,82	48,5	3,02	6,2	
	Carioca - 5	89,58	86,4	43,1	43,3	3,18	7,3	
CONTROLE	Carioca - 6	166,86	158,61	116,54	42,07	8,25	19,6	16,86
	Carioca - 7	63,09	59,54	38,15	21,39	3,55	16,5	
	Carioca - 8	81,81	75,34	35,91	39,43	6,47	16,4	
	Carioca - 9	98,37	90,76	52,56	38,2	7,61	19,9	
	Carioca - 10	76,54	72,45	37,7	34,75	4,09	11,7	

Anexo B: Modelo de classificação adotado baseado nos sistema CS de Rison, Hodgman e Thorton (2000) e MIPS modificados.

1. Metabolismo

1.1 Energia

- 1.1.1 Metabolismo energia (autotrófico)
- 1.1.2 Metabolismo energia (carbon)
- 1.1.3 Transferência de energia/ força motivo de próton

1.2 Macromoléculas

- 1.2.1 Polissacarídeos/ lipopolissacarídeos
- 1.2.2 Proteoglicanos/ glicoproteínas
- 1.2.3 Fosfolipídios/ glicolipídios/ lipoproteínas

1.3 Micromoléculas

- 1.3.1 Metabolismo de amino-ácidos
- 1.3.2 Metabolismo de nitrogênio/ enxofre/ selênio
- 1.3.3 Metabolismo de nucleotídeos/ nucleosídeos
- 1.3.4 Metabolismo de fósforo
- 1.3.5 Metabolismo de carboidrato
- 1.3.6 Metabolismo de lipídios/ ácidos graxos e esteróis
- 1.3.7 Biossíntese de vitaminas/ co-fatores e grupos prostéticos
- 1.3.8 Metabolismo secundário

2. Processo

2.1 Processos celulares

- 2.1.1 Divisão celular
- 2.1.2 Transdução de sinais
- 2.1.3 Marcação/ Endereçamento de proteínas
- 2.1.4 Regulação celular
- 2.1.5 Ciclo nuclear/ cromossomal
- 2.1.6 Desdiferenciação
- 2.1.7 Morte celular
- 2.1.8 Sinalização celular

2.2 Processos do organismo

- 2.2.1 Adaptação
- 2.2.2 Resposta ao Estresse
 - 2.2.2.1 Resposta ao estresse Oxidativo

- 2.2.2.2 Resposta ao estresse Salino
 - 2.2.2.3 Resposta à Luz
 - 2.2.2.4 Resposta ao Calor
 - 2.2.2.5 Resposta ao Frio
 - 2.2.2.6 Resposta à Deficiência Nutricional
 - 2.2.2.7 Resposta ao estresse Hídrico
 - 2.2.3 Defesa à doenças/virulência
3. Transporte
- 3.1 Macromoléculas
 - 3.1.1 Transporte de peptídeos/ proteínas
 - 3.1.2 Transporte de ácidos nucleicos
 - 3.1.3 Transporte de lipídios
 - 3.2 Micromoléculas
 - 3.2.1 Canais de íons/ porinas/ transportadores de íons
 - 3.2.2 Transportadores de açúcares de carboidratos
 - 3.2.3 Transportadores de amins/ aminoácidos
 - 3.2.4 Transportadores de nucleosídios/ nucleotídios/ purinas/ pirimidinas
 - 3.2.5 Transportadores ABC/ Transporte de ATPases
 - 3.2.6 Carregadores (transporte dado por diferença eletroquímica de potencial)
4. Estrutura e organização de estrutura
- 4.1 Membrana/ Envelope celular
 - 4.1.1 Membrana celular
 - 4.1.2 Parede celular
 - 4.2 Exterior celular
 - 4.2.1 Estruturas de superfície
 - 4.2.2 Polissacarídeos/ Antígenos de superfície
 - 4.3 Relaciona a ribossomo
 - 4.3.1 RNA ribossomal
 - 4.3.2 Proteína ribossomal
 - 4.4 Outros elementos estruturais
 - 4.4.1 Cromossomos
 - 4.4.2 Organelas
 - 4.4.3 Vesícula de transporte intracelular

5. Vias de informação

5.1 Relacionado à DNA

- 5.1.1 Síntese e Replicação de DNA
- 5.1.2 Restrição/Modificação e Reparo de DNA
- 5.1.3 Recombinação de DNA
- 5.1.4 Degradação de DNA

5.2 Relacionado à RNA

- 5.2.1 Síntese de RNA
- 5.2.2 Relacionado à Transcrição
- 5.2.3 Modificação de RNA
- 5.2.4 Degradação de RNA

5.3 Relacionado à proteína

- 5.3.1 Síntese de proteína
- 5.3.2 Aminoacil-tRNA sintetase/tranferase e aminoacil-tRNA
- 5.3.3 Relacionado à tradução (iniciação/elongação/terminação)
- 5.3.4 Modificação/ Fosforilação de proteína
- 5.3.5 Dobramento/ Chaperonamento de proteína
- 5.3.6 Degradação de proteína
- 5.3.7 Proteína de ligação

6. Miscelânea

6.1 Elementos de origem externa

- 6.1.1 Relacionado a fago ou vírus
- 6.1.2 Relacionado à transposons
- 6.1.3 Relacionado à plasmídio

6.2 Não classificado/ desconhecido

- 6.1.2 não classificado
- 6.1.3 desconhecido