

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANA LUIZA AHERN BERALDO

Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em
resposta à indução da resistência por silício

Piracicaba

2012

ANA LUIZA AHERN BERALDO

Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em
resposta à indução da resistência por silício

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba

2012

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

Beraldo, Ana Luiza Ahern

Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em resposta à indução da resistência por silício / Ana Luiza Ahern Beraldo; orientadora Siu Mui Tsai. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

172 f. : il.

Tese (Doutorado – 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. Biologia molecular 3. Expressão gênica 4. Feijão 5. Fungos fitopatogênicos 6. Interação planta-patógeno 7. Microscopia eletrônica de varredura 8. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 575.111 : 633.35

Dedico este trabalho ao meu pai Antonio Ludovico, e aos meus irmãos Ana Lúdia e Francisco, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso;

Ao Almir, por me amar, me apoiar, por ser meu companheiro e me fazer muito feliz;

A toda minha família, em especial aos meus queridos avós Gervásio e Efigênia;

A todos meus amigos que de certa forma me apoiaram durante o decorrer deste trabalho;

Ofereço este trabalho a minha mãe, Maria Amélia, pela sua força, coragem e determinação. Por ser uma pessoa maravilhosa, capaz de sorrir, mesmo na dor, conseguindo só ver o lado bom da vida. Você é um exemplo a ser seguido.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Profa. Siu Mui Tsai, não só pela orientação, ensinamentos e oportunidades de aprendizado concedidas durante estes anos, mas principalmente pela sua generosidade;

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP pelas oportunidades concedidas no decorrer deste trabalho e principalmente aos funcionários da Pós, sempre dispostos a ajudar;

Ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudos;

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Fábio Duarte, Elias Gomes, Wagner Piccinini e principalmente ao Francisco Montrazi (Chiquinho), pelo apoio nos experimentos, ajuda na casa de vegetação e principalmente pela amizade...vamos sentir saudades de você;

À Danielle Gregógio Gomes Caldas, pelos conselhos durante o decorrer do trabalho;

À querida Ludmila Campos, sempre presente, sorridente e prestativa;

Ao Bean Team Aline, Milena, Enéas e Gustavo;

A todos os alunos da Profa. Tsai: Acácio, Bia, Clóvis, Caio, Dennis, Felipe, Fernanda, Lina, Lucas, Marcela, Marina, Marília e Naissa;

Aos alunos do Laboratório de cima: Rafael, Carol e Fabiana pelos dias divertidos que passamos juntos, e em especial a minha querida Maria Julia (Maju) vou sentir falta dos nossos papos...Aos alunos que já saíram do CENA, Aline, Amanda, Mariana Redondo e principalmente a Mariana Germano, pessoa especial...muito querida;

Em especial aos meus meninos queridos Enéas e Gustavo. Eu sempre serei grata a vocês pela amizade sincera que construímos nesses quatro anos;

Ao Welligton e Juan pela amizade, risadas, jantares;

Aos amigos Thiago Mezetti, Fernanda Raquel, Regina Priolli e Natalie pelas distrações nos finais de semana;

Aos pesquisadores do Centro de Grãos e Fibras do IAC: Sérgio Augusto Moraes Carbonell e Alisson Fernando Chiorato não só por me cederem todo o espaço necessário para a realização dos experimentos de inoculação, disponibilização de sementes, pela ajuda nas avaliações, mas também pelo carinho e confiança que depositaram em mim durante todos esses anos;

Ao Centro de Fitopatologia do IAC, principalmente a Profa. Margarida Fumiko Ito e Renata Guillen, pela gentileza e pela disponibilização dos isolados do patógeno;

Ao pesquisador do CBMEG-UNICAMP Dr. Márcio José da Silva, não só pelo sequenciamento e análises dos dados de bioinformática, mas também pela amizade construída durante esses anos;

À Profa Adriana Martinelli pela disponibilização do espaço e regentes para os experimentos de Microscopia e em especial a técnica Monica Lanzoni Rossi, pessoa muito querida e sempre disposta a ajudar, responsável pelas fotos realizadas durante este trabalho.

Ao laboratório NAP/MEPA da ESALQ/USP, em especial ao Prof. Elliot Watanabe Kitajima não só pela disponibilização do uso do microscópio, mas também pela simpatia e gentileza;

Ao professor Mario Fernando de Goes pela disponibilização do equipamento de EDX e ao Adriano L. Martins, pela ajuda na obtenção das análises;

A toda a minha família de Boa Esperança do Sul e de Paulínia;

Ao amigo Carlos Ivan Aguillar Vildoso.

Aos meus amigos da Panela 99 que me acolheram muito bem e que hoje são meus amigos também.

RESUMO

BERALDO, A. L. A. **Expressão diferencial de genes induzidos por antracnose em feijoeiro em resposta à indução da resistência por silício**. 2012. 172f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

O feijão é importante fonte carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. No Brasil, a produtividade desta leguminosa é baixa e um dos fatores é a ocorrência de doenças como a antracnose causada pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, que gera perdas de até 100% da produção. Plantas possuem diversos mecanismos de defesa contra patógenos e relatos apontam que o silício é capaz não só de promover mudanças morfológicas nas folhas, mas também de ativar os genes de resistência. O presente trabalho foi dividido em três estudos que tinham como objetivo: (1) entender a resposta de três cultivares de feijoeiro ao silício disponível na solução nutritiva; (2) identificar a contribuição do Si na expressão de genes relacionados à infecção pelo fungo através da construção de duas bibliotecas subtrativas por supressão (SSH), visando selecionar genes diferencialmente representados durante a infecção da planta com a raça 65 de *C. lindemuthianum* (a) e durante a infecção da planta na presença de uma maior dose silicato de potássio (75 ppm) no substrato (b); (3) identificar a resposta de dez transcritos selecionados no Estudo 2 para tentar entender a resposta dos mesmos em diferentes períodos (0; 6; 42; 72 h) após a inoculação, com ou sem suplemento de Si. Como resultados, foi observado que para as três cultivares avaliadas o Si começa a ser absorvido 14 dias após o transplante. Também foi identificado por de microscopia de varredura (MEV) que não há diferença significativa entre o número de tricomas e cada cultivar, mas que para o número de estômatos a cultivar IAC-Harmonia destacou-se das demais. Além disso, quando as três cultivares foram suplementadas com Si, houve a formação de uma cera epicuticular descrita como mecanismo de defesa da planta contra fungos; e que através de EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) foi possível constatar que plantas tratadas com Si apresentam maior teor deste elemento nas folhas. Através de inoculações com a raça 65 do patógeno verificou-se o efeito do mineral na redução da severidade da doença nas cultivares IAC-Harmonia e Pérola. No segundo estudo, duas bibliotecas de hibridização subtrativa por supressão (SSH), foram construídas visando selecionar os genes diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não-inoculadas (A) e entre plantas inoculadas e tratadas ou não com 75 ppm de Si (B). Foram geradas 991 sequências únicas, anotadas através do *GeneOntolgy*. Quinze genes de cada biblioteca foram selecionados para os experimentos de validação por RT-qPCR. Para a Biblioteca A, 11/15 genes foram positivamente regulados, e em B, 14/15. No terceiro estudo ficou evidenciado que a inoculação com o patógeno alterou positivamente a expressão de sete genes, enquanto que o tratamento com 75 ppm de Si alterou a expressão de oito genes, em pelo menos um dos tempos avaliados.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. *Colletotrichum lindemuthianum*. Silicato de potássio. Biblioteca de hibridização subtrativa por supressão (SSH). Expressão gênica. RT-qPCR.

ABSTRACT

BERALDO, A. L. A. Differential expression of genes activated by anthracnose in response to silicon induced resistance. 2012. 172 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Beans are an important source of carbohydrates, vitamins, minerals and fibers. In Brazil, this legume still has low productivity and one of the factors involved is the occurrence of diseases such as anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, which causes losses in production of up to 100%. Plants present several defense mechanisms against pathogens and the reports indicate that silicon does not only promote morphological changes in leaves, but also activates resistance genes. This work was divided into three studies aiming: (1) to understand the response of three bean cultivars to a silicon source in a nutrient solution, (2) to identify the contribution of Si in the expression of genes related to the infection by the fungus by constructing two subtractive suppression libraries (SSH), to select genes differentially represented during infection of the plant with race 65 of *C. lindemuthianum* (a) and during infection of the plant in the presence of higher dose of potassium silicate (75 ppm) in the substrate (b), (3) to identify the response of ten selected transcripts in Study 2 in various periods (0, 6, 42, 72 h) after inoculation, with or without supplemental Si. As a result, it was observed that for all three cultivars Si begins to be absorbed 14 days after transplantation. Was also identified by microscopy (SEM) that there is no significant difference between the number of trichomes among cultivars, but that the number of stomata for the IAC-Harmonia stood out from the rest. Moreover, when the three cultivars were supplemented with Si, thus forming an epicuticular wax described as a defense mechanism against plant fungi, and that by EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) it was found that plants treated with Si have higher content of this element in leaves. Through inoculations with race 65 of the pathogen it was verified the effect of the mineral in reducing disease severity in IAC-Pérola and IAC - Harmonia. In the second study, two libraries from suppression subtractive hybridization (SSH) were constructed in order to select the differentially expressed genes between inoculated and non-inoculated (A) and between plants inoculated and treated or not with 75 ppm of Si (B). In total, 991 unique sequences were generated, those recorded by GeneOntolgy. Fifteen genes from each library were selected for the validation experiments by RT-qPCR. For library A, 11/15 genes were positively regulated, and in B, 14/15. In the third study it is showed that inoculation with the pathogen positively altered expression of seven genes, whereas treatment with 75 ppm of Si changed the expression of eight genes, in at least one of the times analyzed.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. *Colletotrichum lindemuthianum*. Potassium silicate. Suppressive subtractive hybridization (SSH). Gene expression. RT-qPCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Hipótese	23
1.2	Objetivos	23
1.2.1	Objetivo geral	23
1.2.2	Objetivos específicos	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Importância econômica e social da cultura do feijoeiro	25
2.2	Antracnose do feijoeiro	27
2.3	Indução de resistência	32
2.4	O papel do silício na indução de resistência nas plantas	35
2.4.1.	Absorção pelas plantas	35
2.4.2.	Benefícios	37
2.4.3.	Estresses bióticos	38
2.4.4.	Estresse abióticos	40
2.5	Identificação e isolamento de genes de resistência	40
2.6	Classificação de genes através da ferramenta Gene Ontology (GO)	44
2.7	Análise de expressão gênica através de RT-qPCR em tempo real	45
	REFERÊNCIAS	47
3	ESTUDO 1: RESPOSTA DO FEIJOEIRO SUPLEMENTADO COM SILÍCIO AO ESTRESSE CAUSADO PELO FUNGO <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	57
	RESUMO	57

ABSTRACT	58
3.1 INTRODUÇÃO	59
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.2.1 Material Vegetal	58
3.2.1.1 Determinação do teor de silício nas folhas de feijoeiro diferentes estádios de desenvolvimento da planta	60
3.2.1.2.Determinação do teor de silício nas folhas de feijoeiro em três diferentes variedades de feijoeiro	62
3.2.1.3 Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de luz (MO) e EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)	62
3.2.1.4.Teste de verificação da raça do patógeno	64
3.2.1.5.Verificação da atenuação da infecção por <i>C. lindemuthianum</i> pelo silicato de potássio	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.3.1 Absorção de silício em diferentes estádios fenológicos do feijoeiro	66
3.3.2. Absorção diferencial de silício entre genótipos de feijoeiro	68
3.3.3 Modificações morfológicas e/ou estruturais em folhas tratadas com silício	69
3.3.3.1.Análises de folhas não tratadas com silício	69
3.3.3.2.Análises de folhas tratadas com silício	71
3.3.3.3. Verificação da remediação da antracnose pelo silicato de potássio	77
3.3.3.4.Alterações na espessura da epiderme	80
3.3.3.5.Determinação de silício através do EDX	82
3.4 CONCLUSÕES	84

REFERÊNCIAS	85
4 ESTUDO 2: DETERMINAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ATRAVÉS DE BIBLIOTECA SSH	89
RESUMO	89
ABSTRACT	90
4.1 INTRODUÇÃO	91
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
4.2.1 Material vegetal.....	92
4.2.2 Bibliotecas.....	92
Biblioteca A.....	92
Biblioteca B.....	93
4.2.3 Extração e Purificação de RNA total.....	93
4.2.4 Purificação do mRNA	94
4.2.5 Construção da biblioteca subtrativa de cDNA	95
4.2.6 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD-PCR.....	95
4.2.7 Cromatografia em coluna.....	97
4.2.8 Digestão das fitas de ds-cDNA.....	97

4.2.9	Purificação da digestão e ligação dos Adaptadores.	98
4.2.10.	Ligação dos adaptadores.	98
4.2.11	Análise da ligação	99
4.2.12	Hibridizações	100
4.2.13	Amplificação das sequências de cDNA diferencialmente expressas	101
4.2.14	Purificação do DNA	101
4.2.15	Clonagem em vetor usando pGEM®- T Easy Vector	101
4.2.16.	Transformação em bactérias quimiocompetentes	102
4.2.17.	Preparação de DNA plasmidial em placas	102
4.2.18	Protocolo de sequenciamento	103
4.2.19	Análise das sequências (Bioinformática)	103
4.2.20	Anotação das sequências através do Gene Ontology (GO)	105
4.2.21	Desenho dos primers para validação das bibliotecas	105
4.2.22	Validação das duas bibliotecas subtrativas por RT-qPCR	110
4.2.23	Análise dos dados de expressão	111
4.2.24	Programas LinRegPCR e REST	112
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
4.3.1	Sequenciamento e bioinformática.	112
4.3.2	Categorização dos genes pelo programa Gene Ontology	120

4.3.3	Validação das bibliotecas por qRT-PCR.....	124
4.4	CONCLUSÕES	128
	REFERÊNCIAS	129
5	Estudo 3: Análise da Expressão Gênica em resposta a infecção por <i>C. lindemuthianum</i>, e suplemento de Si.....	132
	RESUMO	132
	ABSTRACT	133
5.1	INTRODUÇÃO	134
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	135
5.2.1	Análise da expressão dos genes selecionados sob efeito do ataque do patógeno e suplementação com Si.....	136
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
5.3.1	Variação da expressão gênica de genes responsivos ao estresse por antracnose e/ou suplemento de Si.....	138
5.4	CONCLUSÕES	160
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXOS.....	167

1 INTRODUÇÃO

A produtividade do feijoeiro no Brasil é considerada baixa, e vários fatores estão relacionados a isso, como por exemplo, adversidades climáticas, deficiências na adubação e/ou fertilidade do solo, uso inadequado de cultivares e de espaçamento de plantas, zoneamento agrícola inadequado, e principalmente devido à ocorrência de doenças e pragas em toda a época de plantio da cultura.

Dentre essas doenças, destaca-se a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, por ser frequente não apenas no estado de São Paulo, mas também em todos os estados produtores de feijão do Brasil (ALZATE-MARIN; SARTORATO, 2004). Esta doença causa um impacto negativo na cultura do feijoeiro, pois as vagens infectadas resultam em um decréscimo na qualidade e número dos grãos (BÉRNARD-CAPELLE et al., 2006) e dependendo do grau de infecção, pode causar perdas de até 100% da produção (BIANCHINI et al., 2005).

Na natureza, este patógeno pode penetrar na planta através de aberturas naturais como estômatos ou ferimentos; através da penetração forçada (força mecânica exercida pelo patógeno); ou mesmo através da secreção de enzimas que degradam a cutina, facilitando a penetração; e, por fim, a última hipótese é que ambos os mecanismos possam interagir para auxiliar a penetração (BAILEY et al., 1992).

Sendo assim, a resposta de defesa de plantas contra patógenos está associada com diversos eventos precoces e tardios, no que se diz respeito ao início do estresse. Vários eventos fisiológicos, moleculares e celulares, como ativação do metabolismo de estresse oxidativo, mudanças no fluxo iônico ou mesmo na síntese de fitoalexinas e de uma série de proteínas relacionadas à patogênese (PR), ocorrem durante a resposta da planta seguida da infecção pelo patógeno. Além disso, as plantas são capazes de aumentar a força da matriz extra-celular através da formação de cutina e deposição de calosidades. Estas respostas ativas e passivas levam tanto a defesas locais quanto sistêmicas contra uma série de ataque de patógenos (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998; OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002; SAROWAR et al., 2009; FALARA et al., 2011; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011).

Diferentes compostos inorgânicos ou orgânicos e diversas substâncias de origem biológica induzem resistência em plantas. Essas substâncias foram denominadas indutores, devido a sua capacidade de induzir resistência contra doenças nas plantas tratadas, sem

apresentarem um efeito antimicrobiano direto sobre os agentes patogênicos. Os indutores podem ser compostos inorgânicos, como sais de fosfato (OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002); compostos orgânicos, como os ácidos graxos araquidônico, linoleico, linolênico e oleico (COQUOZ et al., 1995); quitosanas (BENHAMOU; THERIAULT, 1992); ácido salicílico, (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998), dentre outros.

Diversos estudos comprovam o efeito do silício na ativação de genes envolvidos na produção de compostos secundários do metabolismo, como os polifenóis e enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa (FAUTEAUX et al., 2005) e acúmulo de componentes antifúngicos como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (FAWE et al., 1998; RÉMUS-BOREL; MENZIES; BÉLANGER, 2005; FAUTEUX et al., 2006). Além disso, a ação benéfica da aplicação de silício em plantas tem sido associada a outros efeitos como: aumento na capacidade fotossintética, plantas mais eretas, redução da transpiração, aumento da resistência mecânica das células, maior resistência das plantas a insetos e doenças; diminuição do efeito tóxico de certos metais pesados; maior tolerância ao estresse hídrico e salino e a radiação ultravioleta, dentre outros (LANA et al., 2003; SHEN et al., 2010; HASHEMI; ABDOLZADEH; SADEGHIPOUR, 2010; CHEN et al., 2011).

Desta forma, o presente trabalho se propõe a elucidar o efeito do silicato de potássio durante a interação feijoeiro *vs* a raça 65 de *C. lindemuthianum*. Para isso, genótipos de feijoeiro, contrastantes para a resposta à antracnose foram utilizados nas análises buscando identificar modificações estruturais nas folhas e/ou atenuação da infecção pelo patógeno após o tratamento com silicato de potássio.

Além disso, a identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra patógenos. A técnica de hibridização subtrativa (DIATCHENKO et al., 1996) foi a metodologia escolhida por permitir que apenas os transcritos diferencialmente expressos durante esta interação sejam selecionados. Desta forma, dois conjuntos de bibliotecas subtrativas foram criados, a primeira visando selecionar transcritos presentes durante a infecção do feijoeiro pelo *C. lindemuthianum* e a segunda, também selecionando transcritos que ocorrem durante a infecção porém em plantas tratadas com o silicato de potássio. Os transcritos diferencialmente selecionados nas duas bibliotecas foram usados nos experimentos de expressão gênica no decorrer do tempo após a infecção.

1.1 Hipóteses

- a) O silício é capaz de induzir ou aumentar a resistência de *Phaseolus vulgaris* contra estresses bióticos;
- b) Plantas tratadas com silício devem apresentar modificações estruturais na parede celular da epiderme foliar, dificultando, assim, a penetração de patógenos;
- c) Como o Si atua como indutor de resistência, ele deve favorecer uma expressão diferencial dos genes relacionados à defesa do feijoeiro contra *C. lindemuthianum*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O presente estudo propôs-se a analisar a contribuição do silicato de potássio em promover mudanças na morfologia, na atenuação da infecção e na expressão de genes de plantas da variedade IAC-Harmonia inoculada com a raça 65 de *C. lindemuthianum*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar a resposta do feijoeiro à adição de silicato de potássio na solução nutritiva, visando identificar em qual fase do desenvolvimento a planta aumenta a absorção de Si; verificar o teor de Si absorvido por diferentes variedades de feijoeiro; analisar se o Si é capaz de promover alguma mudança estrutural nas folhas e avaliar se a aplicação de Si é capaz de promover uma redução nos sintomas da infecção do feijoeiro pela raça 65 de *C. lindemuthianum*;
- b) Identificar através da construção de duas bibliotecas de hibridização subtrativa por supressão (SSH), genes diferencialmente expressos na interação feijoeiro vs *Colletotrichum*

lindemuthianum e de feijoeiro vs *Colletotrichum lindemuthianum* em condições normais ou acrescidas de silício;

c) Analisar a expressão temporal destes genes em plantas de feijoeiro sob três tipos de estresse: (i) inoculados com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e irrigados com solução nutritiva contendo 75ppm de silicato de potássio; (ii) inoculados com a raça 65 *C. lindemuthianum* e irrigados com solução nutritiva sem adição de silicato de potássio e (iii) não-inoculados com o patógeno e irrigados com solução nutritiva sem adição de silicato de potássio, de através de PCR em tempo real.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância econômica e social da cultura do feijoeiro

Entre as leguminosas, o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*) é considerado a segunda cultura de maior importância atrás apenas da soja (SINGH; MUÑOZ, 1999). O feijoeiro é uma das culturas mais antigas do Novo Mundo e junto com o milho e a mandioca, foram os principais alimentos nas Américas por milênios. Em alguns países como México e Brasil, os feijões são a principal fonte de proteínas consumida por estas populações. O feijão também é fonte de ferro, fósforo, magnésio, manganês, zinco, cobre, cálcio (BROUGHTON et al., 2003), carboidratos, vitaminas, minerais e fibras da população brasileira (BULISAMI, 2003). Um adulto chega a consumir de 15 a 20 kg de feijão por ano, o que fornece cerca de 10 a 20% dos nutrientes necessários para seu desenvolvimento (BROUGHTON et al., 2003).

A organização atual da diversidade genética no conjunto gênico de espécies cultivadas do feijoeiro é resultado da evolução natural e do cultivo durante os séculos. Antes da domesticação, o feijoeiro selvagem já tinha se divergido em dois grandes centros de origem, o Mesoamericano e o Andino, cada um deles com suas distribuições geográficas características (GEPTS, 1998).

Grande parte dos produtores de feijão na América Latina incluindo o Brasil possuem pequenas fazendas cujo tamanho varia de 1 a 10 hectares (BROUGHTON et al., 2003). O feijoeiro é uma das culturas de elevada relevância socioeconômica para o Brasil, sendo os principais produtores: Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, os quais respondem por mais de 65% da produção nacional. Em 2011 as grandes regiões produtoras de cereais, leguminosas e oleaginosas apresentaram a seguinte distribuição: Região Centro-Oeste, 62,8 milhões de toneladas; Sul, 56,5 milhões de toneladas; Sudeste, 18,4 milhões de toneladas; Nordeste, 16,4 milhões de toneladas; e Norte, 4,5 milhões de toneladas. Para 2012, o Mato Grosso lidera como maior produtor nacional de grãos, com uma participação de 23,1%, seguido pelo Paraná, com 19,3% e Rio Grande do Sul, com 12,5% (IBGE, 2012). Ainda segundo o IBGE, para o feijão da 2ª safra, a produção esperada registra um incremento de 3,1% frente a fevereiro, alcançando 1.397.398 toneladas, acréscimo observado em função da

estimativa de maior de área plantada nos estados de Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás.

Ainda para 2012, a estimativa da área a ser cultivada com as principais culturas é 4,8% maior que a cultivada na safra 2010/2011, passando de 49,89 para 52,29 milhões de hectares, representando um aumento de 2,4 milhões de hectares. A estimativa da área cultivada em 2012 com feijão sinaliza uma diminuição de área na maioria dos Estados produtores, principalmente devido aos problemas climáticos adversos onde os Estados mais prejudicados foram: Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Desta forma, o somatório das áreas consolidadas e previstas para o cultivo de feijão, nas três épocas de plantio, deve ser de 3,9 milhões de hectares, 2,4% a menos que na safra 2010/2011 (CONAB, 2012).

A evolução das práticas culturais, aliadas ao desenvolvimento de cultivares modernas e a adoção de tecnologias pelos agricultores brasileiros, permitiu expressivo ganho em produtividade, saindo de patamares de 500 kg/ha de média nacional, no final da década de 1970, para 1.000 kg/ha na safra de 2009/2010 (RICHETTI; de MELO; de SOUZA, 2011). Entretanto, esses valores ainda são considerados baixos e vários fatores estão relacionados a isso, como a ocorrência de adversidades climáticas, deficiências na adubação e/ou fertilidade do solo, uso inadequado de cultivares e de espaçamento de plantas, zoneamento agrícola inadequado, e principalmente a presença de pragas e doenças em toda a época de plantio da cultura.

Até o momento, a maneira mais eficiente de prevenir doenças no campo é através do uso de sementes livres de contaminação, uso de variedades resistentes e aplicação de fungicidas ao longo do ciclo da cultura. Esforços consideráveis foram dispendidos no desenvolvimento de cultivares melhoradas para combater os patógenos do feijoeiro, entretanto, a duração destas cultivares é limitada, devido principalmente a rápida emergência de novas raças do patógeno (SINGH; SCHWARTZ, 2010; BOTELHO et al., 2011).

Segundo Graham e Ranalli (1997), as doenças de maior destaque para a cultura são a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), cretamento bacteriano (*Xanthomonas campestris* Pv *phaseoli*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) e mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*).

2.2 Antracnose do feijoeiro

A antracnose é causada pelo fungo Ascomiceto da espécie *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo a mais importante e frequente não apenas no estado de São Paulo, mas também em todos os estados produtores de feijão do Brasil (ALZATE-MARIN et al., 2004). A resistência à antracnose é condicionada por onze genes independentes, *Co-1* ao *Co-13* sendo o *Co-9/Co-3³* e o *Co-7/Co-3* alélicos, já caracterizados. Com exceção do gene recessivo *co-8*, todos os outros genes são dominantes e exibem multialelismo em *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5* (Tabela 1). Nove genes de resistência (*Co-2* ao *Co-11*) foram identificados em genótipos Mesoamericanos e *Co-1*, *Co-12* e *Co-13* em genótipos Andinos (Tabela 1).

A distribuição destes genes em ambos os centros de origem os torna viáveis a serem amplamente utilizados nos programas de melhoramento, contribuindo para a redução da vulnerabilidade do feijoeiro ao fungo (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009).

Um dos fatores limitantes para o controle da antracnose no feijoeiro é a existência de um grande número de raças de *C. lindemuthianum*. Além disso, existe ainda o surgimento de novas raças, o que justifica a importância de se caracterizar tanto as raças como os bancos de germoplasma, em busca de novas fontes de resistência, para introduzi-las em futuros programas de melhoramento (BIGIRIMA; HÖFTE, 2001).

Tabela 1 - Símbolos dos genes de resistência á antracnose, as fontes genéticas, os centros de origem (A – Andino; MA – Mesoamericano) e as referências dos genes de resistência á antracnose (BIC, 2012)

Símbolo dos Genes	Fonte Genética	Centros de Origem	Referências
<i>Co-1</i>	Michigan Dark Red Kidney	A	KELLY et al., 2003
<i>Co-1²</i>	Kaboon	MA	MELOTTO; KELLY, 2000
<i>Co-1³</i>	Perry Marrow	MA	MELOTTO; KELLY, 2000
<i>Co-1⁴</i>	AND 277	MA	ALZATE-MARIN et al., 2003a
<i>Co-1⁵</i>	Widusa	MA	GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006
<i>Co-2</i>	Cornell 49-242	MA	MASTENBROEK, 1960
<i>Co-3</i>	Mexico 222	MA	BANNEROT, 1965
<i>Co-3²</i>	Mexico 277	MA	FOUILLOUX, 1979
<i>Co-3³</i>	BAT 93	MA	GEFFROY et al., 1999
<i>Co-4</i>	TO	MA	FOUILLOUX, 1979
<i>Co-4²</i>	SEL 1308; G2333	MA	YOUNG et al., 1998
<i>Co-4³</i>	PI 207262	MA	ALZATE-MARIN et al., 2002
<i>Co-5</i>	TU	MA	YOUNG et al., 1998
<i>Co-5²</i>	SEL 13060	MA	VALLEJO; KELLY, 2009
<i>Co-6</i>	AB 136	MA	SCHWARTZ et al., 1982
<i>Co-7</i>	HI; MSU 7-1; G2333	MA	YOUNG et., 1998
<i>co-8</i>	AB 136	MA	ALZATE-MARIN et al., 1997
<i>Co-9</i>	BAT 93	MA	GEFFROY et al., 1999
<i>Co-10</i>	Ouro Negro	MA	ALZATE-MARIN et al., 2003b
<i>Co-11</i>	Michelite	MA	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007
<i>Co-12</i>	Jalo Vermelho	A	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008
<i>Co-13</i>	Jalo Listras Pretas	A	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2009

A classificação das raças é feita com base nas variedades afetadas pelo patógeno seguindo normas descritas pelo CIAT (1990). Segundo Young et al., (1998), a raça fisiológica do isolado é determinada adotando-se valores binários, através da reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras a cada isolado. Os somatórios dos valores binários referentes à reação de suscetibilidade das variedades diferenciadoras determinam a raça fisiológica do isolado inoculado (Tabela 2). Por exemplo, neste caso, a raça 65 é confirmada quando a doença afeta os genótipos Michelite e México 222.

Tabela 2 - Variedades diferenciadoras, código binário, genes de resistência e origem das variedades diferenciadoras (A – Andino; MA – Mesoamericano) usadas na caracterização das raças de *C. lindemuthianum* (adaptado de CIAT, 1990; Balardin et al., 1997 e Awale et al., 2007)

Variedade Diferenciadoras	Código Binário	Genes de Resistência	Origem
1 Michelite	1	<i>Co-11</i>	MA
2 Michigan Dark Red Kidney	2	<i>Co-1</i>	A
3 Perry Marrow	4	<i>Co-1³</i>	A
4 Cornell 49-242	8	<i>Co-2</i>	MA
5 Widusa	16	<i>Co-1⁵</i>	A
6 Kaboon	32	<i>Co-1²</i>	A
7 Mexico 222	64	<i>Co-3</i>	MA
8 PI 207262	128	<i>Co-4³; Co-9</i>	MA
9 TO	256	<i>Co-4</i>	MA
10 TU	512	<i>Co-5</i>	MA
11 AB 136	1024	<i>Co-6; co-8</i>	MA
12 G 2333	2048	<i>Co-4²; Co-5²; Co-7</i>	MA

Nos programas de melhoramento da cultura, uma escala de notas é adotada para a avaliação dos sintomas da antracnose (CIAT, 1990). Segundo Balardin; Pastor-Corrales; Oyoya (1990) a nota um (1) indica uma planta sem sintomas (resistente); a nota três (3) indica plantas que possuem pequenas lesões, geralmente nas folhas primárias (resistentes); e notas de cinco (5) a nove (9) representam grandes lesões presentes nas faces abaxial e adaxial das folhas, inclusive no hipocótilo (suscetível). O *C. lindemuthianum* causa um impacto negativo na cultura do feijoeiro, pois as vagens infectadas resultam em um decréscimo na qualidade e número dos grãos (BÉRNARD-CAPELLE; SOUBEYRAND; NEEMA, 2006), causando prejuízo ao agricultor.

A Figura 1 apresenta de forma esquemática a escala de notas utilizada na avaliação dos sintomas. Os sintomas da antracnose surgem em toda parte aérea da planta. As lesões crescem causando podridão de coloração preta, enfraquecendo a planta e tornando-a incapaz de suportar a copa (ZAMBOLIM; CHAVES, 1978).

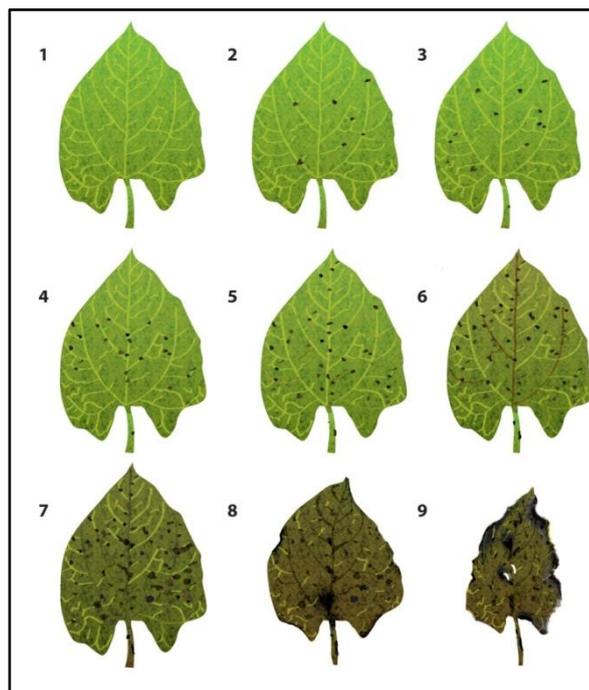


Figura 1 - Escala de notas utilizadas na avaliação da severidade da antracnose (adaptada de Balardin; Pastor-Corrales; Oyoya, 1990)

A disseminação da doença pode ocorrer através de vários agentes como, por exemplo, a chuva e o vento. Porém, a maior fonte de inóculo, do ponto de vista epidemiológico, é o uso de sementes infectadas. A ampla distribuição das raças fisiológicas no Brasil é facilitada pelo livre comércio de grãos entre os estados e pela reutilização dos mesmos para futuros plantios em uma mesma área, acarretando em aumento no potencial de inóculo do patógeno de uma safra para outra (TOMAZELLA et al., 2000).

Na natureza, o patógeno pode penetrar na planta através de aberturas naturais como estômatos ou ferimentos; penetração forçada (força mecânica exercida pelo patógeno); secreção de enzimas que degradam a cutina (esterases), facilitando a penetração; e, por fim, a última hipótese é que ambos os mecanismos possam interagir para auxiliar a penetração (BAILEY et al., 1992).

Após a adesão do esporo de *C. lindemuthianum* na folha do feijoeiro, ocorre a germinação e a formação do tubo germinativo que se diferencia em uma estrutura de infecção chamada apressório (Figura 2). Esta estrutura é a responsável pela penetração no tecido foliar. O apressório se torna rígido e com isso, um *peg* de infecção é formado. Esta estrutura é a responsável pela penetração do tecido foliar (RODRIGUEZ; REDMAN, 1998; PERFECT et al., 1999).

C. lindemuthianum possui um processo de infecção chamado de hemibiotrófico que é composto de duas fases: biotrófica e necrotrófica. Durante a primeira fase, o patógeno consegue parasitar a célula vegetal sem destruí-la. Isso é muito importante para o fungo, pois se as células parasitadas morrerem, o que ocorre durante a resposta hipersensitiva, isso vai gerar a síntese de fitoalexinas e outros compostos químicos de defesa, o que leva ao impedimento do desenvolvimento do patógeno. As vesículas de infecção são outro ponto importante no mecanismo de patogênese deste fungo. Estas estruturas são responsáveis por manterem as células infectadas vivas. A primeira hifa intracelular cresce a partir destas vesículas e atravessa a epiderme e as células corticais (BAILEY et al., 1992; RODRIGUEZ; REDMAN, 1992; LATUNDE-DADA, 2001).

Nas primeiras 48 horas após o desenvolvimento destas estruturas, as células permanecem normais. Posteriormente, as células apresentam um desbalanço osmótico e o citoplasma começa a degenerar. Consecutivamente, ocorre a transição para a fase necrotrófica do patógeno, em que a célula vegetal começa a sofrer degeneração. Nesta fase, a planta tenta então sintetizar diversos fatores de resistência como as fitoalexinas e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas. Nestas condições, os tecidos vegetais são mortos antes da síntese dos fatores de resistência, em plantas suscetíveis (BAILEY et al., 1992; RODRIGUEZ; REDMAN, 1992; LATUNDE-DADA, 2001).

Durante a fase necrotrófica, o patógeno cresce rapidamente, atingindo o interior das células, as paredes celulares e os espaços intracelulares. As raças de *C. lindemuthianum* produzem diversas enzimas capazes de destruir componentes estruturais dos tecidos foliares como, por exemplo, as degradadoras de carboidratos, de parede celular, as que hidrolizam cutículas e as que degradam pectinas (BAILEY et al., 1992; RODRIGUEZ; REDMAN, 1992; LATUNDE-DADA, 2001).

Um resumo destes eventos pode ser visualizado na Figura 2 que mostra um esquema de infecção pelo fungo hemibiotrófico *C. lindemuthianum*. O esporo (S) ligado à superfície do hospedeiro germina e forma o tubo de germinação, que se diferencia em um apressório melanizado (A). A hifa de penetração (PE) se desenvolve na base do apressório, transformando a pressão interna em uma força mecânica para perfurar a cutícula e a parede celular. A hifa de penetração intumesce as células da epiderme para formar a vesícula (V) e hifas primárias (PH), que são cercadas por invaginações da membrana plasmática. O protoplasto da célula hospedeira continua vivo durante a fase biotrófica (a) e a matriz interfacial separa o protoplasto do fungo e do hospedeiro (amarelo). Um ou dois dias após a

penetração, a desintegração da membrana plasmática se inicia, levando a morte da célula (b); novas células do hospedeiro são colonizadas pela hifa primária, no entanto as hifas primárias podem continuar a se dispersar pelas células adjacentes (c) para formar hifas secundárias (SH) que não são mais cercadas pelas membranas do hospedeiro. Como resultado, ocorre o colapso da parede celular vegetal devido à secreção de grande quantidade de enzimas degradantes secretadas pelas hifas secundárias, tendo como consequência a morte das células hospedeiras, caracterizando assim a fase necrotrófica do fungo (MENDGEN; HAHN, 2002).

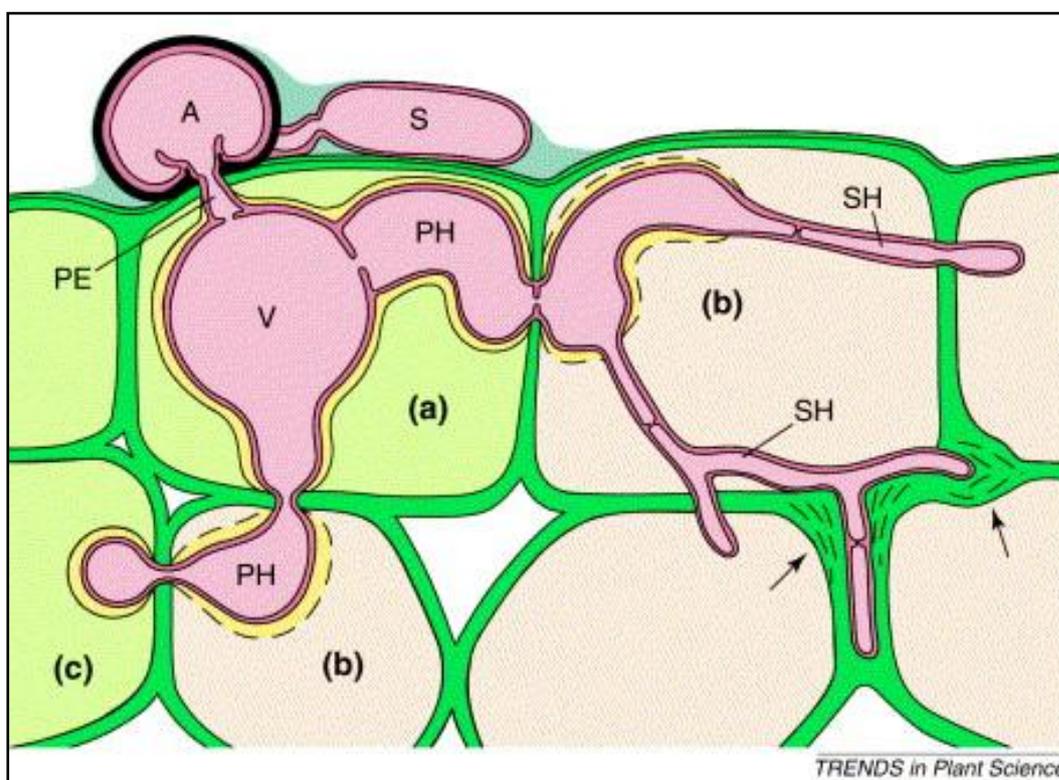


Figura 2 - Esquema mostrando o modo de infecção do feijoeiro pelo *C. lindemuthianum* (MENDGEN; HAHN, 2002)

2.3 Indução de resistência

O fenômeno de indução de resistência sistêmica ou resistência sistêmica adquirida (SAR – *Systemic Acquired Resistance*) é usualmente referido como a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas pela infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001; STICHER; MAUCH-MANI;

MÉTRAUX, 1997; e KUC, 2001). Estudos mostraram que, em diferentes interações entre hospedeiro e patógeno, a SAR resulta na proteção de plantas contra uma ampla variedade de fitopatógenos, devido à ativação de diversos mecanismos de resistência. Entre os mecanismos ativados tem sido observada a resposta de hipersensibilidade, resultando na morte localizada de células do hospedeiro no sítio de infecção do patógeno (ORBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002) ou alterações estruturais, levando ao fortalecimento da parede celular vegetal pelo depósito de calose e de lignina (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998).

Diferentes compostos inorgânicos ou orgânicos e diversas substâncias de origem biológica induzem resistência em plantas. Essas substâncias foram denominadas indutores, devido a sua capacidade de induzir resistência contra doenças nas plantas tratadas, sem apresentarem um efeito antimicrobiano direto sobre os agentes patogênicos. Os indutores podem ser compostos inorgânicos, como sais de fosfato (ORBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002); compostos orgânicos, como os ácidos graxos araquidônico, linoleico, linolênico e oleico (COQUOZ et al., 1995); quitosanas (BENHAMOU; THERIAULT, 1992); ácido salicílico, (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998), dentre outros.

A ativação rápida de reações de defesa em associação com a morte celular do hospedeiro é freqüentemente denominada de resposta de hipersensibilidade. A morte localizada de algumas células vegetais no sítio de penetração de patógenos pode se constituir em um processo eficaz para a contenção de patógenos biotróficos, que necessitam de células vivas para obtenção de nutrientes durante seu desenvolvimento. Foi demonstrado, em algumas interações entre hospedeiro e patógeno, que o tratamento das plantas com determinados indutores de resistência levava à ativação direta de um conjunto de respostas de defesa. Entretanto, alguns mecanismos de resistência são ativados apenas após a inoculação subsequente das plantas com agentes patogênicos. Nesse caso, o tratamento prévio com indutores de resistência predispõe as plantas suscetíveis para ativar respostas de defesa mais rapidamente e intensamente do que plantas não induzidas, quando em contato com agentes patogênicos. Hipotetiza-se que os indutores de resistência possuem, dessa forma, um duplo papel na ativação de respostas de defesa. Este mecanismo, denominado de preparo ou sensibilização (*priming*), foi demonstrado em *Arabidopsis* (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002; e KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002).

Plântulas de uma cultivar suscetível de *Vigna unguiculata*, obtidas a partir de sementes tratadas com Acibenzolar-S-Metil (ASM), mostraram-se protegidas contra a antracnose causada por *C. destructivum*. Após a penetração, o patógeno permaneceu confinado nas

primeiras células da epiderme do hospedeiro, que apresentaram uma reação de hipersensibilidade acompanhada de necrose e do aumento rápido de atividade da Fenilalanina amônio liase (PAL) e Chalcona isomerase (CHI), duas enzimas chave nas vias biossintéticas de fenilpropanoides e flavonoides, respectivamente. Subsequentemente, foi observado nos tecidos vegetais, o acúmulo rápido das fitoalexinas de leguminosas, kievitona e faseolidina. Nas plantas suscetíveis não tratadas com ASM e inoculadas com o patógeno, o aumento de atividade das enzimas e a síntese das fitoalexinas ocorreram de forma tardia e em concentrações bem menores, quando comparados com as plantas induzidas à resistência. Os autores inferiram que o acúmulo desses compostos nas plantas pré-tratadas com o ASM, após a inoculação, impediu a colonização dos tecidos do hospedeiro por *C. destructivum*, confinando o patógeno no sítio de penetração (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001).

As enzimas hidrolíticas β -1,3-glucanase e quitinase são conhecidas pela sua importância na defesa das plantas, pois elas catalizam a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos: a quitina e o β -1,3-glucano. Campos et al (2009) avaliou o potencial da raça delta avirulenta do *C. lindemuthianum*, como protetora contra raças virulentas deste fungo e quanto a capacidade de induzir resistência sistêmica em feijoeiro. Quatro variedades foram testadas quanto as alterações nas atividades de β -1,3-glucanase e quitinase, três dias após a aplicação dos esporos de *C.lindemuthianum* da raça delta avirulenta, em comparação com aplicações de água e de ácido salicílico. Em seguida, as plantas foram infectadas com a raça virulenta 33/95 e depois de cinco dias, foram submetidas aos ensaios bioquímicos para detecção da atividade das enzimas. Os autores afirmam que houve acréscimo significativos nas atividades da β -1,3-glucanase e quitinase, após a inoculação com o fungo indutivo e que a correlação entre o índice de severidade da doença e a atividade das enzimas foi altamente significativa. Desta forma, o uso de *C. lindemuthianum* da raça delta avirulenta, assim como o uso do ácido salicílico, diminuíram a intensidade da doença e pode ter potencial para controlar a antracnose do feijoeiro.

De Freitas; Stadnik (2012) usaram extratos da alga marinha *Ulva spp.* como indutora de resistência, aplicada 6 e 3 horas antes da inoculação com a raça 73 de *C. lindemuthianum* em feijoeiro. Os autores monitoraram o teor de peroxidases, descritas como enzimas envolvidas em resposta de estresse em plantas e de glucanases, que hidroliza os β -1,3-glucanos que são os principais componentes celulares dos fungos, emitidos após a inoculação. Os resultados mostraram que o extrato de *Ulva spp.* foi capaz de aumentar a atividade da peroxidase nas plantas resistentes ao patógeno. Já a atividade da glucanase foi maior nos

genótipos resistentes e suscetíveis ao patógeno. Desta forma, a indução por *Ulva* spp. parece ser consistente e hábil para promover uma proteção intermediária contra a antracnose, pelo menos em feijoeiro.

2.4 O papel do silício na indução de resistência nas plantas

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na litosfera (27,7%), podendo ser encontrado em mono e dicotiledôneas em quantidades equivalentes ao fósforo e ao magnésio (FAUTEUX et al., 2005). O silício no solo só é encontrado na forma de óxidos ou silicatos. Uma vez que o dióxido de silício compreende de 50 - 70% da massa do solo, todas as plantas irão apresentar algum conteúdo de Si em seus tecidos (NEUMANN; NIEDEN, 2001; MA; YAMAJI, 2008). Ele é absorvido pela planta na forma de ácido silícico (H_2SiO_3) e se precipita nas folhas na forma de sílica amorfa, sílica gel ou opala ($SiO_2.nH_2O$) (RICHMOND; SUSSMAN, 2003).

A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos, dentre os quais, destacam-se o aumento na capacidade fotossintética, plantas mais eretas, redução da transpiração, aumento da resistência mecânica das células, maior resistência das plantas a insetos e doenças e diminuição do efeito tóxico de certos metais pesados (LANA et al., 2003). O silício é o único elemento que confere resistência a diversos estresses causados em plantas e é também o único elemento que não causa danos quando acumulado em excesso (MA et al., 2002).

Este elemento tem sido utilizado na forma de fertilizante em vários países, como o Brasil, Japão, Ilhas Maurícius, Estados Unidos, Austrália e África do Sul. No Brasil, o Si foi recentemente incluído na Legislação para Produção e Comercialização de Fertilizantes e Corretivos como micronutriente benéfico para as plantas e, portanto, pode ser comercializado isoladamente ou em mistura com outros nutrientes (RODRIGUES et al., 2011).

2.4.1 Absorção pelas plantas

O processo de absorção do ácido monossilícico, que possui carga neutra, ocorre pela membrana das células epidérmicas, de um local de alta para outro de baixa concentração, pela dissolução através da membrana, podendo ocorrer por apoplasto ou simplasto. Como a

membrana hidrofóbica não permite entrada de água e carregamento de soluto, a passagem do ácido monossilícico para dentro da célula da raiz pode correr por difusão ativa ou por canais de entrada de água (RAVEN, 2001). O Si é absorvido pela planta na forma de ácido silícico (H_2SiO_3) e é transportado através do xilema e depositado nas paredes das células, principalmente nas folhas, na forma de sílica amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (RICHMOND; SUSSMAN, 2003).

Ainda segundo Rodrigues et al. (2011), o Si é absorvido pelas raízes das plantas na forma neutra como ácido monossilícico (H_4SiO_4), por processo passivo ou ativo, através de transportadores de membrana específicos para este fim. O transporte do ácido monossilícico é feito via xilema, e pode ser regulado pela transpiração ou por processo ativo.

As plantas diferem quanto à capacidade de absorver e acumular Si e podem ser classificadas em três grupos: acumuladoras de Si, em geral as monocotiledôneas (família Poaceae), que tem processo ativo de absorção de Si, possuindo teor foliar acima de 10 g.kg^{-1} de Si na matéria seca; as não acumuladoras, em geral as leguminosas, que absorvem Si através de um fluxo de transpiração de forma mais lenta que a absorção de água, com teor foliar menor que 5 g.kg^{-1} de Si na matéria seca; e as intermediárias, que tem absorção do Si por simplasto na mesma velocidade que a absorção de água e teor menor que 10 g.kg^{-1} na matéria seca (TAKAHASHI; MA; MIYAKE, 1990).

Oliveira (2009) tentou desvendar o mecanismo de translocação de Si em plantas de arroz e de feijoeiro em solução nutritiva suplementada com silicato de potássio e por solução nutritiva contendo o isótopo estável ^{30}Si . As plantas de arroz ficaram nessa solução por 30 dias e as plantas de feijoeiro por 15 dias. Em seguida, a adição dos dois tipos de silicatos foi interrompida com o objetivo de verificar se o silício já depositado nas folhas “velhas” eram translocados para as folhas “novas”. Decorridos 60 dias as folhas “velhas” e “novas” das duas plantas foram coletadas e tiveram suas amostras analisadas através de espectometria de massa. Os resultados mostraram que uma vez que o Si é depositado nas folhas “velhas”, não é mais redistribuído para as folhas “novas”, mostrando a necessidade de se ter fontes de silicato disponíveis para as plantas durante seu desenvolvimento.

Este mesmo padrão também foi descrito em feijoeiro por Carneiro et al., (2010). Segundo os autores, isto acontece porque o $\text{Si}(\text{OH})_4$ polimeriza e se precipita gradualmente nas raízes, caule e folhas e que o processo de polimerização no qual o SiO_2 se forma é um processo irreversível, tornando o Si imobilizado quando chega na parede celular.

2.4.2 Benefícios

Já foram descritos diversos benefícios do uso do silício em plantas como, por exemplo, melhorias nas propriedades mecânicas (estatura, penetração das raízes no solo, exposição das folhas à luz, devido à modificações estruturais na planta), redução na transpiração, tolerância à seca e salinidade e a metais tóxicos e principalmente na composição química e enzimática da planta, alterando a resistência ou tolerância a patógenos, ativando a produção de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa da planta (FAUTEUX, 2005; RODRIGUES et al., 2011). O silício tende-se a polimerizar nas paredes celulares, lúmen celular, espaços intercelulares e na camada subcuticular, levando a mudanças na anatomia da folha, resultando em células epidérmicas mais grossas ou com um grau maior de lignificação. Ao acumular-se nas células da camada epidérmica, esta barreira física torna-se estável e dificulta a penetração de alguns tipos de fungos (EPSTEIN, 1999).

Em feijoeiro, ainda não se sabe o exato mecanismo de absorção de Si. Ele é geralmente encontrado nos tecidos que mais sofrem transpiração, levando a crer que o Si possa ser transportado passivamente das raízes até as folhas através do fluxo de transpiração (MA et al., 2002; RICHMOND; SUSSMAN, 2003) e quando a água evapora, o ácido silícico se torna saturado sendo então precipitado.

Em arroz, o mecanismo de absorção já foi amplamente estudado e já se sabe que existem transportadores de Si. Um deles (*Lsi1*) é responsável por transportar o silício da solução externa para as células corticais da raiz. O outro (*Lsi2*), é responsável por levar o silício para o xilema. Diferentemente do *Lsi1*, o *Lsi2* não consegue absorver Si do meio externo, levando a acreditar que o *Lsi2* é um transportador de efluxo de Si, enquanto que o *Lsi1* é de influxo (MA et al., 2007a, 2007b). Ambos *Lsi1* e *Lsi2* são expressos nas mesmas camadas celulares de raízes, mas com diferença na polaridade; um é encontrado na exoderme e o outro na endoderme, *Lsi1* é encontrado no lado distal da célula, carrega o Si disponível para dentro da célula e então o *Lsi2* que fica do lado proximal da célula, exporta o Si para o apoplasto. A cooperação entre *Lsi1* e *Lsi2* leva a uma alta e eficiente absorção de silício e conseqüentemente a sua acumulação em arroz (MA; YAMAJI, 2006; MA et al., 2007a, 2007b; YAMAJI; MA, 2011).

O Si transportado via *Lsi1* e *Lsi2* é então translocado para as folhas pelo fluxo de transpiração através do xilema. Este transporte do Si do xilema para as células do parênquima é feito pelo transportador *Lsi6* (YAMAJI; MA, 2008). A diferença então de absorção existente

entre diferentes cultivares em arroz, está relacionada ao número e níveis de expressão dos genes transportadores de Si presentes nas raízes (MA et al., 2007b).

Yamaji e Ma (2011) verificaram que os padrões de expressão por RT-qPCR entre os genes *Lsi1* e o *Lsi2* são similares em arroz, indicando que *Lsi2* é co-regulado com *Lsi1* e que estes dois genes respondem aos estresses ambientais (seca e ácido abscísico) e de acordo com a necessidade fisiológica da planta (época de enchimento de grãos).

Fang et al., (2011) sugerem que o *Lsi1* funciona controlando a acumulação de silício em arroz, e a inibição da expressão deste gene poderá reduzir sua absorção, o que pode resultar em um decréscimo da tolerância da planta em diversos estresses. Então os autores hipotetizam que, regulando o nível de transcritos de *Lsi1*, a tolerância da planta a diversos estresses pode aumentar. Este gene desempenha um papel crucial na absorção de Si uma vez que, mutações neste gene resultam em um decréscimo considerável na absorção e acumulação do elemento (MA et al., 2002; MA, 2004 e YAMAGI; MA, 2007). Outros estudos sobre a função e localização destes genes também foram descritos para arroz (HUANG; ZHANG; ZHAO, 2012).

Transportadores de Si também já foram identificados em outras culturas. Plantas de milho possuem dois transportadores de ácido monossilícico já descritos, sendo o *ZmLsi1*, responsável pelo influxo de silício, ou seja, responsável pelo transporte de Si da solução externa para a células da raiz e o gene *ZmLsi6*, que transporta o Si das células do córtex da raiz para as células do xilema (MITANI et al., 2009).

Em cevada, o gene *HvLsi1* é localizado no lado distal das células da membrana plasmática, nas células do córtex das raízes e nas raízes laterais na membrana plasmática da exoderme (CHIBA et al., 2009). Estudos também demonstram a função do *Lsi1* como responsável pela absorção de silício do solo também foram descritos em abóboras (MITANI et al., 2011).

2.4.3 Estresses bióticos

O silício contribui para a ativação de genes envolvidos na produção de compostos secundários do metabolismo, como os polifenóis e enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa (FAUTEUX et al., 2005). Além disso, a indução de resistência através do uso do silício pode desencadear uma cascata de mecanismos de defesa da planta, através do acúmulo

de componentes antifúngicos como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (FAWE et al., 1998).

Em trigo, ensaios de HPLC foram realizados visando desvendar o efeito do Si como indutor de componentes anti-fúngicos como as fitoalexinas, em plantas inoculadas com oídio. As plantas não infectadas pelo patógeno e tratadas com o mineral, não apresentaram diferenças no nível de produção destes componentes. No entanto, quando as plantas tratadas com Si foram infectadas pelo patógeno, a produção destas fitoalexinas passou a ser significativamente diferente, demonstrando que a presença do estresse (no caso, a inoculação) é necessária para a ativação das respostas de defesa (RÉMUS-BOREL; MENZIES; BÉLANGER, 2005).

Em feijoeiro, o efeito de diferentes concentrações de inóculo e de diferentes fontes de silicato foi avaliado quanto ao controle da incidência da antracnose nas folhas. O tratamento com silicato de sódio levou a uma redução de 62,4% na severidade da antracnose em relação à testemunha não tratada com o mineral (MORAES et al., 2006).

Em plantas de café, inoculadas com ferrugem e suplementadas com Si, foi possível observar que as atividades das enzimas do estresse oxidativo Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), e Ascorbato peroxidase (APX) foram maiores em plantas tratadas com o mineral, indicando o silício parece estimular uma resposta mais rápida ao estresse oxidativo (MARTINATI, 2008).

A hipótese para o controle das doenças pelo Si, tanto em mono quanto em dicotiledôneas, tem sido atribuída à barreira mecânica resultante da polimerização desse elemento na planta. Entretanto, outros estudos revelaram que a resistência mediada pelo Si contra patógenos está associada com a acumulação de compostos fenólicos e fitoalexinas, além da ativação de alguns genes relacionados à patogênese (PR). Esses resultados revelam que o Si tem um papel ativo na resistência de algumas plantas às doenças e não exerce apenas uma barreira mecânica que impede o ingresso dos fitopatógenos (RODRIGUEZ; DATNOFF, 2005; FAUTEUX et al., 2006). O efeito do aumento da resistência à doenças através do silício já foi amplamente avaliada em diferentes culturas. Em arroz, por exemplo, a aplicação de silício diminuiu a incidência da ferrugem (SEEBOLD et al., 2000 e 2001), em trigo infectados com oídio (GUÉVEL; MENZIES; BÉLANGER, 2007); em trigo infectados por *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (CHAIN et al., 2009); em tomate infectado por *Ralstonia solanacearum* (GHAREEB et al., 2011) e em milho, o Si foi capaz de reduzir a o dano causado à planta pela lagarta do cartucho (GOUSSAIN et al., 2002);

2.4.4 Estresse abióticos

O silício é conhecido pelo efeito de mitigar a toxidez a vários estresses abióticos como manganês, alumínio, metais pesados, seca, calor e frio. Os ânions silicatados aumentam o pH do solo, podendo fazer com que a atividade dos elementos tóxicos seja diminuída, precipitando-os em compostos insolúveis ou formando polímeros de baixa disponibilidade para as plantas (RODRIGUES et al., 2011). Segundo Liang et al. (2007), os mecanismos-chaves que o silício usa para aliviar os estresses abióticos nas plantas incluem: (1) estimulação do sistema antioxidante da planta; (2) complexação ou co-precipitação de metais tóxicos com o Si; (3) imobilização dos íons de metais tóxicos em meio de cultivo; (4) processo de absorção; e (5) compartimentalização de íons metálicos nas plantas.

Em trigo, aplicação de silício pode promover o acúmulo de água nas plantas sobre estresse hídrico, contribuindo para aliviar os danos fotossintéticos ao qual a planta estaria submetida (GONG; CHEN, 2012). O efeito do aumento da resistência de estresses abióticos através do uso de silício já foi amplamente observado em diferentes culturas como em soja submetida à seca e a radiação ultravioleta (SHEN et al., 2010); em plantas de canola submetidas a estresse salino (HASHEMI; ABDOLZADEH; SADEGHIPOUR, 2010); e em arroz submetido a estresse hídrico (CHEN et al., 2011).

A descoberta do uso do Si como um composto capaz de reduzir os sintomas de doenças em plantas desperta o interesse pelo seu uso no controle de doenças. Aliado a este fato, o Si parece não influenciar diretamente os patógenos, não sendo considerado um fungicida e, portanto não causa por pressão de seleção a triagem de linhagens mais resistentes. Através do uso de uma fonte rica de silicato prontamente disponível (ex. palhada de gramíneas) ou via fornecimento ao solo ou folha, o silício contribui para o aumento do grau de supressão a patógenos, podendo aumentar significativamente a produção e a qualidade, o que torna seu uso viável do ponto de vista técnico e ecológico.

2.5 Identificação e isolamento de genes de resistência

A identificação de genes de plantas envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência contra patógenos. A seleção diferencial de

bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de mRNAs isolados de plantas submetidas a determinado tipo de estresse, por exemplo tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações entre hospedeiro e patógeno.

Uma metodologia para o isolamento de genes diferencialmente expressos que foi desenvolvida por Diatchenko et al., (1996), chamada de Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH), que se baseia na amplificação preferencial de sequências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA, enquanto que o fenômeno da supressão impede a amplificação das sequências comuns.

A identificação de genes diferencialmente expressos pode levar a melhores percepções sobre os mecanismos moleculares que envolvem doenças ou outros processos biológicos. Esta metodologia pode ser realizada na ausência de qualquer informação sobre a sequência, e é muito importante quando se quer identificar genes de organismos não-modelos, ou de micro-organismos específicos (HUANG et al., 2007).

O princípio de construção desta biblioteca baseia-se nos seguintes aspectos: os mRNAs obtidos a partir de ambas as populações alvo e, portanto expressos diferencialmente (*targets*) são utilizados para construir de forma isolada duas bibliotecas de cDNA. A população em que se deseja selecionar genes de interesse é chamada de *tester*, sendo a outra (testemunha) considerada como *drivers*. Os fragmentos de cDNA *tester* são divididos em duas amostras (1 e 2) e ligados com dois diferentes adaptadores (adaptador 1 e adaptador 2), resultando em duas populações de *tester*.

A técnica de SSH usa duas hibridizações. Primeiro, um excesso de driver é adicionado a cada amostra *tester*. As amostras são então desnaturadas por altas temperaturas e esfriadas para re-anelamento das fitas. O cDNA da fração *tester* pode então ser encontrado nas seguintes condições:

- (a) Normalizada, onde concentrações de cDNAs de alta e baixa abundância se tornam razoavelmente iguais. A normalização ocorre porque o processo de reanelamento gera homo-híbridos de cDNAs;
- (b) Enriquecida significativamente com cDNAs para genes diferencialmente expressos;
- (c) Enriquecida com o *driver*.

Na segunda hibridização, as duas amostras da primeira hibridização são então misturadas. Apenas os cDNAs *tester* que remanesceram normalizados e subtraídos são capazes de reassociar e formar então as moléculas híbridas (b), (c), e (e) (Figura 3).

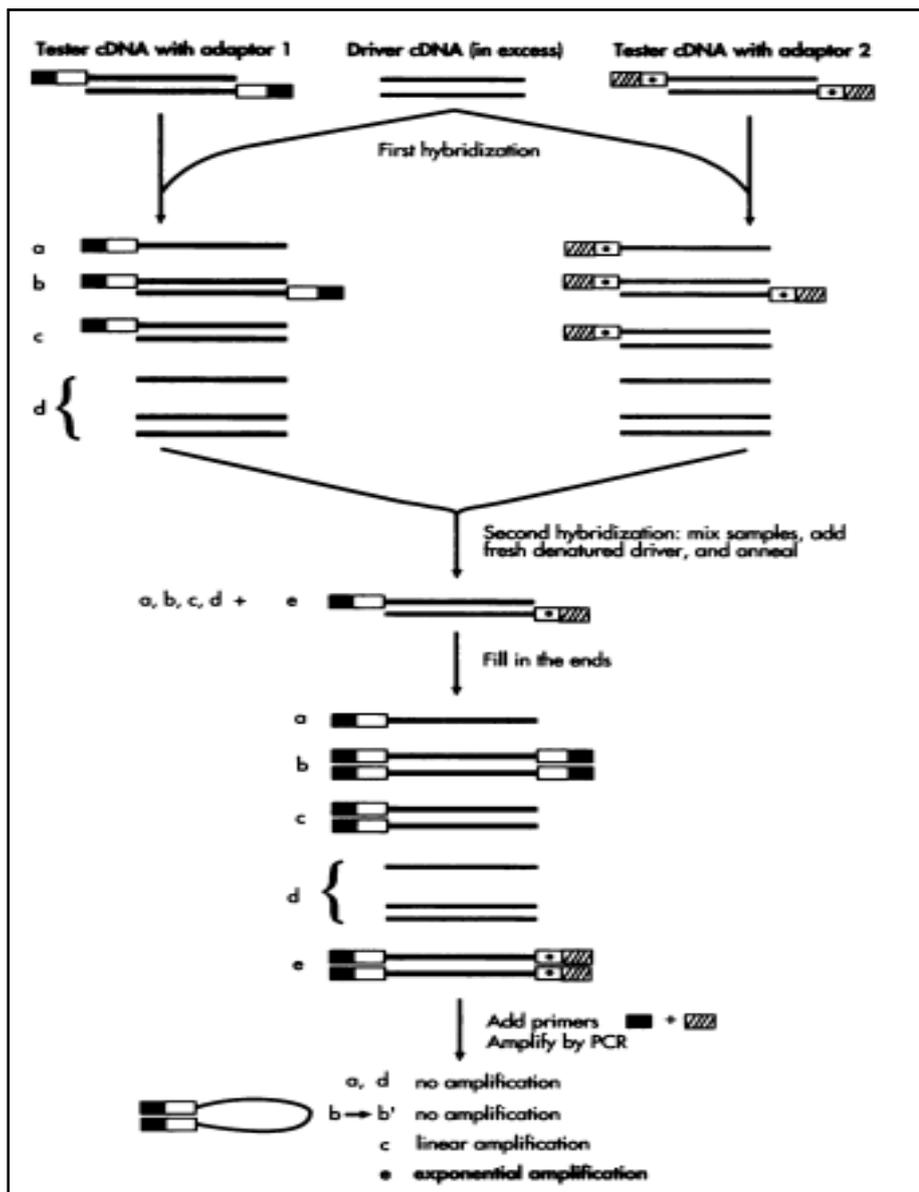


Figura 3 - Esquema da construção de bibliotecas subtrativas (DIATCHENKO et al., 1996)

A adição de uma segunda porção de *driver* desnaturado neste estágio enriquece a fração de genes diferencialmente expressos (e). Os híbridos recém-formados (e) possuem uma importante característica que os diferenciam dos híbridos (b) e (c) formados durante a primeira e segunda hibridizações: eles possuem sequências de adaptadores em suas extremidades 5'. Uma provém da amostra 1 e a outra, da amostra 2. As duas sequências permitem uma amplificação preferencial da fração subtrativa e normalizada (e), quando usado em reação de PCR um par de *primers* P1 e P2, que correspondem a parte mais externa da sequência dos adaptadores 1 e 2, respectivamente.

Em todos os ciclos da reação de PCR, uma amplificação exponencial pode ocorrer apenas com as moléculas do tipo (e). Moléculas do tipo “b” contêm sequências repetitivas invertidas longas nas suas extremidades e formam estruturas “grampos” após cada etapa de desnaturação. Essa estrutura não serve como template para um PCR exponencial porque o anelamento intramolecular é mais forte do que o anelamento com os primers. Este efeito é chamado de supressão da PCR.

As moléculas do tipo (a) e (b) não possuem os sítios de anelamento para os primers usados na reação, e as moléculas do tipo (c) podem ser amplificadas apenas numa taxa linear – e não exponencialmente. Apenas as moléculas do tipo (e) possuem adaptadores diferentes em suas extremidades que permitem sua amplificação exponencial na reação de PCR.

A técnica da SSH foi aplicada em cafeeiros tratados com o indutor S-metil-acilbenzolar (ASM), com o propósito de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência sistêmica adquirida de plantas suscetíveis a *Hemileia vastatrix*. Os resultados sugerem um aumento de atividade de diversos processos relacionados à resistência contra patógenos como: formação de espécies reativas de oxigênio, resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, síntese e transporte de metabólitos antimicrobianos, percepção e transdução de sinal, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, metabolismo de lipídeos e degradação controlada de proteínas (GUZZO, 2004).

Trabalhos usando a técnica de SSH para identificar genes diferencialmente expressos são amplamente usados para diferentes fins como, por exemplo, na identificação de genes diferencialmente expressos em duas variedades (resistente e suscetível) de *blueberry* após a inoculação com *C. acutatum* (MILES; DAY; SCHILDER, 2011). Neste estudo, foi possível identificar que dentre os genes mais expressos, 37 estavam correlacionados com defesa da planta como quitinase, proteínas relacionadas à patogênese, β -1,3-glucanase, além de genes relacionados ao estresse.

Outro trabalho envolvendo a construção de bibliotecas SSH foi realizado em raízes de *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze, submetidas a 21 dias de estresse hídrico. Neste caso também foi possível detectar 123 possíveis genes responsivos ao estresse hídrico como os da ubiquitina-proteosoma, genes do metabolismo de glutatona e vários fatores de transcrição (DAS; DAS; MONDAL, 2012).

2.6 Classificação de genes através da ferramenta *Gene Ontology* (GO)

Pesquisas na área de genômica funcional cresceram rapidamente na última década, particularmente com plantas. A geração massiva de sequências e o rápido desenvolvimento de tecnologias de genômica funcional de plantas geraram uma forte demanda na área de bioinformática, adaptadas para as espécies cultivadas. A anotação funcional de novas sequências de DNA em plantas é provavelmente uma das principais etapas na genômica funcional de plantas, uma vez que é a chave para a interpretação biológica dos resultados experimentais (CONESA; GÖTZ, 2008).

A interpretação funcional é o passo chave para a análise deste tipo de dados, e não pode ser realizada sem a disponibilidade de anotações funcionais do banco de dados. Devido aos grandes avanços no sequenciamento e um aumento no número de sequências novas ou não caracterizadas, houve então a necessidade de criação de programas de anotação funcional que facilitassem a interpretação biológica do experimento em questão (CONESA; GÖTZ, 2008).

O programa *Gene Ontology* (GO) é uma tentativa de padronizar a representação dos genes e seus produtos para todos os sistemas biológicos, subdividindo-os em três categorias: (i) Processo Biológico – refere-se à atividade biológica com qual o gene ou seu produto contribui; (ii) Função Molecular – atividade bioquímica do gene ou de um produto gênico; e (iii) Componente Celular – local na célula onde o gene ou seu produto é ativo (NODA et al., 2010). A anotação pelo GO representa um *link* entre um tipo de produto gênico e sua função molecular, processo biológico ou localização celular correspondente (HILL et al., 2008).

O Blast2GO é uma ferramenta online que se vale de um conjunto de ferramentas integradas que permitem acesso a diversos bancos de dados coordenados dentro de um mesmo experimento. O processamento básico dos dados (sequências em formato FASTA) consiste em três etapas: comparação de sequências para encontrar homologias no banco de dados públicos (NCBI) por blastx; mapeamento para coletar termos junto ao *Gene Ontology* e seguidas de anotação para associar informações confiáveis à sequência analisada. Uma vez que os termos do GO são recolhidos, funcionalidades adicionais permitem processar e modificar os resultados anotados (CONESA; GÖTZ, 2008).

Ainda segundo Conesa; Götz (2008), o *Blast2GO* é uma ferramenta bioinformática ideal para pesquisas de genômica funcional de plantas, pois: (1) pode ser usado para qualquer

espécie e pode ser também customizado para a espécie estudada; (2) combina interatividade com alta taxa de processamento e acuracidade; e (3) requer baixo esforço bioinformático para ser utilizado.

Anotações através do Blast2GO já vem sendo bastante usadas em plantas como, por exemplo, em feijoeiro (SCHLUETER et al., 2008; BLAIR et al., 2011), *Arabidopsis thaliana* (PRYANKA et al., 2010), dentre outros.

2.7 Análise de expressão gênica através de RT-qPCR em tempo real

A transcrição reversa seguida da análise da reação quantitativa da reação em cadeia da polimerase (*RT-qPCR*) é uma técnica extremamente sensível e de baixo custo para se quantificar transcritos (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008; SCHEFFE et al., 2006).

Diversos tipos de fluoróforos podem ser usados no Real Time PCR, como o *TaqMan* (sondas ligadas a primers) ou *SYBR Green* (corante intercalante que se liga a dupla fita do DNA). O sistema *SYBR Green* tem sido mais usado por apresentar menor custo e maior sensibilidade no uso. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros que podem ser formados pelos próprios *primers* e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do DNA alvo (NOVAES; PIRES-ALVES, 2004).

A PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina os valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é chamado de *Cycle Threshold* (Ct), ponto este que permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. Sendo assim, os valores de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade do produto amplificado (NOVAES; PIRES-ALVES, 2004).

O princípio da PCR em tempo real consiste em quatro etapas. Na primeira, existe a fase *lag*, onde a amplificação exponencial já começou, mas nenhum sinal abaixo do ruído é detectado. A segunda, na fase logarítmica, o crescimento exponencial do produto de PCR é idealmente dobrado a cada ciclo e é mensurado através de seu sinal fluorescente. Na terceira, na fase de retardamento, a acumulação de fatores inibidores da PCR e a perda de enzima e substrato levam a uma desaceleração da reação. E por fim, na quarta fase, a PCR chega a uma

fase estacionária onde nenhum novo *amplicon* é produzido. Neste caso, os dados da PCR em tempo real são coletados e analisados na segunda fase (KARLEN et al., 2007).

Outro ponto assumido na RT-qPCR em tempo real é que a quantidade de amplicons na fase exponencial é proporcional à quantidade inicial do DNA/cDNA alvo. As análises do RT-qPCR são usualmente baseadas na possibilidade de que todas as amostras analisadas possuem eficiências similares para um produto específico, desde que o mesmo gene seja analisado em cada amostra, com o uso dos mesmos primers específicos. Entretanto, a amplificação de amostras por PCR é um processo que envolve múltiplos componentes incluindo as amostras, *primers*, íons, nucleotídeos, atividade enzimática e a temperatura da reação. Exceto pela temperatura da reação que é bem controlada, todos estes componentes podem sofrer mudanças dinâmicas enquanto a reação progride e isso pode subsequentemente, afetar a eficiência da reação (LIU; SAINT, 2002). Ramakers et al. (2003) e Schefe et al. (2006) demonstraram que existem pequenas variações nas eficiências das PCRs, o que leva a interpretações errôneas da expressão destes genes quando se admite que as eficiências são iguais. Uma forma de contornar este erro é através do uso do programa para correção da eficiência, como o *LinRegPCR*, que através de uma regressão linear calcula a eficiência baseada nas concentrações iniciais de mRNA para cada amostra. Outro problema encontrado para estudos de qPCR é que, antigamente, os cálculos para valores de expressão de genes só podiam ser realizados em apenas um transcrito, limitando assim a técnica. Para solucionar este problema, foi desenvolvido um software chamado *REST (Relative Expression Tool)* que consegue fazer comparações para diferenças significativas entre diferentes grupos (PFAFFL et al., 2002).

A utilização em conjunto da metodologia experimental de *Real Time PCR* aliada a técnicas e programas computacionais de correção de ocasionais desvios faz com que essa análise se torne uma das mais confiáveis na medição de expressão de genes atualmente disponível.

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A.L.; BAIA, G.S.; de PAULA, T.J.; de CARVALHO, G.A.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB136. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 996-998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A.L.; de MORAIS SILVA, M.G.; MOREIRA, M.A.; de BARROS, E.G. Inheritance of anthracnose resistance genes of common bean cultivar PI 207262. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 45, p. 112-113, 2002.
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, K.M.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Allelism studies for anthracnose resistance genes of common bean cultivar AND277. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 46, p. 173-174, 2003a.
- ALZATE-MARIN, A.L.; COSTA, M.R.; ARRUDA, K.M.; de BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Characterization of the anthracnose resistance genes present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, Dordrecht, v. 133, p. 165-169, 2003b.
- ALZATE-MARIN, A.L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 47, p. 241-242, 2004.
- AWALE, H.; FALCONI, E.; VILLATORO, J.C.; KELLY, J.D. Control and characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Ecuador and Guatemala. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 50, p. 85-86, 2007.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection Strategies of *Colletotrichum* species. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. St Paul: APS Press, 88-120, 1992.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, Lancaster, v.87, p.1184-1191, 1997.
- BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 3, p. 243-245, 1990.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, Lancaster, v.87, p.1184-1191, 1997.
- BANNEROT, H. Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'anthracnose. **Annuel de Amélioration des Plantes**, Paris, v. 15, p. 201-222, 1965.

BENHAMOU, N.; THERIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 33–52, 1992.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 13-21, 1998.

BÉRNARD-CAPELLE, J.; SOUBEYRAND, S.; NEEMA, C. Reproductive consequences of *Colletotrichum lindemuthianum* (Ascomycota) infection on wild bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v. 84, p. 1542-1547, 2006.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, São Paulo Ed. 4, p.333-354, 2005.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Bean anthracnose: Inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 403-408, 2001.

BLAIR, M.W.; FERNANDEZ, A.C.; ISHITANI, M.; MORETA, D.; SEKI, M.; AYLING, S.; SHINOZAKI, K. Construction and EST sequencing of full-length, drought stress cDNA libraries for common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **BCM Plant Biology**, London, v. 11, n. 171, p. 1-14, 2011.

Bean Improvement Cooperative (BIC). List of genes. Michigan State University, East Lansing, 2012. Disponível em: <http://bic.css.msu.edu/_pdf/Bean_Genes_List_2010.pdf>. Acesso em abril de 2012.

BOTELHO, F.B.S.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; ROSA, H.J.A. Multiline as a strategy to reduce damage caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, p. 175-180, 2011.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYEDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 55-128, 2003.

BULISAMI, E.A. O feijão na alimentação do brasileiro. In: ANAIS do 19º dia de campo de feijão, v. 71. Capão Bonito, 2003.

CAMPOS, A.D.; HAMPE, M.M.V.; FERREIRA, A.G.; ANTUNES, I.F.; de CASTRO, L.A.S. Indução da resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça dela avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 15-21, 2009.

CARNEIRO, J.M.T.; OLIVERIA, L.A.; ROSSETE, A.L.R.M.; ABREU JR, C.H.; BENDASSOLLI, J.A. Accumulation and translocation of silicon in rice and bean plants using ³⁰Si stable isotope. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, p. 1374-1383, 2010.

CHAIN, F.; CÔTÉ-BEAULIEU, C.; BELZILE, F.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, RR. A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 22, n. 11, p. 1323-1330, 2009.

CHEN, W.; YAO, X.; CAI, K.; CHEN, J. Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 142, p. 67-76, 2011.

CHIBA, Y.; MITANI, N.; YAMAJI, N.; MA, J.F. *HvLsi1* is a silicon influx transporter in barley. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 810-818, 2009.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Research constraints provisionally identified by CIAT. In: **Workshop On Advanced Phaseolus Bean Research Network**, Cali, p.30 , 1990.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira – Safra 2011-2012. Brasília, 2012. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_13_11_04_08_boletim_marco_2012.pdf >. Acesso em abril de 2012).

CONESA, A.; GÖTZ, A. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, p. 1-12, 2008.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.7, p. 210-216, 2002.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 85, n. 10, 1995.

DAS, A.; DAS, S.; MONDAL, T.K. Identification of differentially expressed gene profiles in young roots of Tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] subjected to drought stress using suppression subtractive hybridization. **Plant Molecular Biology Reporters**, New York, n. 1-14, 2012.

De FREITAS, M.B.; STADNIK, M.J. Race-specific and ulvan-induced defense response in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 78, p. 8-13, 2012.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. 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, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.

FALARA, V.; AKHTAR, T.A.; NGUYEN, T.T.H.; SPYROPOULOU, E.A.; BLEEKER, P.M.; SCHAUVINHOLD, I.; MATSUBA, Y.; BONINI, M.E.; SCHILMILLER, A.L.; LAST, R.L.; SCHUURINK, R.C.; PICHERSKY, E. The tomato terpene synthase gene family. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, p. 770-789, 2011.

FANG, C.X.; WANG, Q.S.; YU, Y.; LI, Q.M.; ZHANG, H.L.; WU, X.C.; CHEN, T.; LIN, W.X. Suppression and overexpression of *Lsi1* induce differential gene expression in rice under ultraviolet radiation. **Plant Growth Regulation**, Heidelberg, v. 65, p. 1-10, 2011.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FAUTEUX, F.; CHAIN, F.; BELZILE, F.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.

FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 396-401, 1998.

FOUILLOUX, G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. **Diseases of Tropical Food Crops**, Louvain, p. 221-235, 1979.

GEFFROY, V.; DELPHINE, S.; de OLIVEIRA, J.C.F.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, New York, v. 12, p. 774-784, 1999.

GEPTS, P. Origin and evolution of common beans: past events and recent trends. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 7, p. 1124-1130, 1998.

GHAREEB, H.; BOZSÓ, Z.; OTT, P.G.; REPENNING, C.; STAHL, F.; WYDRA, K. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates the priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, p. 83-89, 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; KELLY, J.D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, Dordrecht, v. 151, p. 411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; LACANALLO, G.F.; VIDIGAL FILHO, P.S. A new gene conferring resistance to anthracnose in Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar 'Jalo Vermelho.' **Plant Breeding**, New York, v. 127, p. 592-596, 2008.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; ROSA DA SILVA, C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; GONELA, A.; KVITSCHAL, M.V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite

and the proposal of a new anthracnose resistance gene, *Co-11*. **Genetic Molecular Biology**, São Paulo, v. 30, p. 589-593, 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; MEDEIROS, A.F.; PASTOR-CORALES, M.A. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance genes. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 133-138, 2009.

GONG, H.; CHEN, K. The regulatory role of silicon on water relations, photosynthetic gas exchange, and carboxylation activities of wheat leaves in field drought conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 34, n. 4, p. 1589-1594, 2012.

GOUSSAIN, M.M.; MORAES, J.C.; CARVALHO, J.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L. Efeito e aplicação de silício em plantas de milho no desenvolvimento biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 305-310, 2002.

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

GUÉVEL, M.H.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 429-436, 2007.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 1-6, 2001.

HASHEMI, A.; ABDOLZADEH, A.; SADEGHIPOUR, H.R. Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grow canola, *Brassica napus* L., plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 56, p. 244-253, 2010.

HILL, D.P.; SMITH, B.; McANDREWS-HILL, M.S.; BLAKE, J.A. Gene Ontology annotations: what they mean and where they come from. **BCM Bioinformatics**, London, v. 9, p. 1-9, 2008.

HUANG, X.; LI, Y.; NIU, Q.; ZHANG, K. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. **Applied Microbiological and Biotechnology**, Heidelberg, v. 76, p. 753-760, 2007.

HUANG, Y.Z.; ZHANG, W.Q.; ZHAO, L.J. Silicon enhances resistance to antimony toxicity in the low-silica rice mutant, *lsi*. **Chemistry and Ecology**, London, p. 1-14, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE-
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202comentarios.pdf acessado em 10.04.2012.

KARLEN, Y.; McNAIR, A.; PERSEGUERS, S.; MAZZA, C.; MERMOD, N. Statistical significance of quantitative PCR. **BCM Bioinformatics**, London, v. 8, n. 131, p. 1-16, 2007.

KELLY, J.D.; GEPTS, P.; MIKLAS, P.N.; COYNE, D.P. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 82, p. 135-154, 2003.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIMI* gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, 2002.

KÚC, J. Concepts and directions of induced systemic resistance in plants and its applications. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 7-12, 2001.

LANA, R.M.Q.; KORNDÖRFER, G.H.; ZANÃO JÚNIOR, L.A.; SILVA, A.F.; LANA, A.M.Q. Efeito do silicato de cálcio sobre a produtividade e acumulação de silício no tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n.2, p. 15-20, 2003.

LATUNDE-DADA, A.O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 187-198, 2001.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 199-208, 2001.

LIANG, Y.; SUN, W.; ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. **Environmental Pollution, London**, v. 147, p. 422-428, 2007.

LIU, W.; SAINT, D.A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 294, p. 347-353, 2002.

MA, J.F. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. **Soil Science Plant Nutrition**, Temuco, v. 50, p. 11-18, 2004.

MA, J.F.; TAMAI, K.T.; ICHII, M.; WU, G.F. A rice mutant defective in Si uptake. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 2111-2117, 2002.

MA, J.F.; YAMAJI, N. Functions and transport of silicon in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, p. 3049 – 3057, 2008.

MA, J.F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **TRENDS in Plant Science**, Kidlington Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 392-397, 2006.

MA, J.F.; YAMAJI, N.; MITAMI, N.; TAMAI, K.; KONISHI, S.; FUJIWARA, T.; KATSUHARA, M.; YANO, M. An efflux transporter of silicon in rice. **Nature**, London, v. 448, p. 209-212, 2007a.

MA, J.F.; YAMAJI, N.; TAMAI, K.; MITAMI, N. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 919–924, 2007b.

MARTINATI, J.C. **Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício**. 2008. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MASTENBROEK, C. A breeding programme for resistance to anthracnose in dry shell haricot beans, based on a new gene. **Euphytica**, Dordrecht, v. 9, 177-184, 1960.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 535-540, 1998.

MAZID, M.; KHAN, T.A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MEDGEN, K.; HAHN, M.; Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 352-356, 2002.

MELOTTO, M.; KELLY, J.D. An allelic series at the *Co-1 locus* conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, Dordrecht, v. 116, p. 143-149, 2000.

MILES, T.D.; DAY, B.; SCHILDER, A.C. Identification of differentially expressed genes in a resistant versus a susceptible blueberry cultivar after infection by *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, n.5, p. 463-477, 2011.

MITANI, N.; CHIBA, Y.; YAMAJI, N.; MA, J.F. Identification and characterization of maize and barley *Lsi2*-like silicon efflux transporter reveals a distinct silicon uptake system from that rice. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, p. 2133-2142, 2009.

MITANI, N.; YAMAJI, N.; AGO, Y.; MA, J.F. Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, p. 231-240, 2011.

MORAES, S.R.G.; POZZA, E.A.; ALVES, E.; POZZA, A.A.A.; CARVALHO, J.G.; LIMA, P.H.; BOTELHO, A.O. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2006.

NEUMANN, D.; NIEDEN, U. Silicon and heavy metal tolerance of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 685-692, 2001.

NODA, R.W.; DAMASCENO, C.M.B.; de SOUZA, S.M. Anotação Funcional de Sequências com BLAST₂GO. **Circular Técnica**, Sete Lagoas, n. 51, 2010.

NOVAES, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OLIVEIRA, L.A. **Silício em plantas de arroz e feijão: absorção, transporte redistribuição e tolerância ao cádmio.** 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 345-353, 2002.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 36, 2002.

PRYANKA, B.; SEKHAR, K.; SUNITA, T.; REDDY, V.D.; KHAREEDU, V.R. Characterization of expressed sequence tags (ESTs) of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) and functional validation of selected genes for abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics Genomics**, Berlin, v. 283, p. 273-287, 2010.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; LEKANNE DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 39, p. 62-66, 2003.

RAVEN, J.A. Silicon transport at the cell and tissue level. In: DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H.; KORNDÖRFER, G.H. **Silicon in Agriculture**, v. 8, p. 41-55, 2001.

RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 108-115, 2005.

RICHETTI, A.; de MELO, C.L.P.; de SOUZA, J.P.B. Viabilidade econômica da cultura do feijão comum, safra 2012, em Mato Grosso do Sul. **Comunicado técnico**, Dourados, n. 173, 2011.

RICHMOND, K.; SUSSMAN, R. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 6, p. 268-272, 2003.

RODRIGUES, F.A.; de OLIVEIRA, L.A.; KORNDÖRFER, A.P.; KORNDÖRFER, G.H. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 134, p. 14-20, 2011.

RODRIGUEZ, F.A.; DATNOFF, L.E. Silicon and Rice Disease Management. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 457-469, 2005.

RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. *Colletotrichum* as a model system for defining the genetic basis of fungal symbiotic lifestyles. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN,

M.B. (Ed.). *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St Paul: APS Press, p. 114-130, 1992.

SAROWAR, S.; KIM, Y.J.; KIM, K.D.; HWANG, B.K.; OK, S.H.; SHIN, J.S. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signalling in tobacco. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 28, p. 419-427, 2009.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_T difference” formula. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, p. 10, 2006.

SCHLUETER, J.A.; GOICOECHEA, J.L.; COLLURA, K.; GILL, N.; LIN, J.Y.; YU, Y.; KURDRA, D.; ZUCCOLO, A.; VALLEJOS, C.A.; MUÑOZ-TORRES, M.; BLAIR, M.W.; TOHME, J.; TOMKINS, J.; McCLEAN, P.; WING, R.A.; JACKSON, S.A. Bac-end sequence analysis and a draft physical map of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genome. **Tropical Plant Biology**, Heidelberg, v. 1, p. 40-48, 2008.

SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M.A.; SINGH, S.P. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 31, p. 741-754, 1982.

SEEBOLD, K.W.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, F.J.; KUCHARÉK, T.A.; SNYDER, G.H. Effect of silicon rate and host resistance on blast, scald and yield of upland rice. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 8, p. 871-876, 2000.

SEEBOLD, K.W.; KUCHARÉK, T.A.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, F.J.; MARCHETTI, M.A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars in rice. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2001.

SHEN, X.; ZHOU, Y.; DUAN, L.; LI, Z.; EGRINYA ENEJI, A.; LI, J. Silicon effect on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 1248-1252, 2010.

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.

SINGH, S.P.; SCHWARTZ, H.F. Breeding for common bean diseases: A review. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2199-2233, 2010.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TAKAHASHI E, MA, J.F, MIYAKE Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments on Agricultural and Food Chemist**, Lausanne, v. 2, p. 99–1022, 1990.

THOMAZELLA C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; VIDA, J.B.; VIDIGAL FILHO, P.S.; RIMOLDI, F. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 43, p.82-83, 2000.

UDVARDI, M.K.; CZECHOWSHI, T.; SCHEIBLE, W.R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 1736-1737, 2008.

VALLEJO, V.; KELLY, J.D. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G 2333. **The Open Horticulture Journal**, Hilversum, v. 2, p. 29-33, 2009.

YAMAJI, N.; MA, J.F. Spatial and distribution and temporal variation of the rice silicon transporter *LSi1*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 1306-1313, 2007.

YAMAJI, N.; MA, J.F. A Transporter at the Node Responsible for Intervascular Transfer of Silicon in Rice. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, p. 2878–2883, 2008.

YAMAJI, N.; MA, J.F. Further characterization of a Rice silicon efflux transporter, *Lsi2*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 259-264, 2011.

YOUNG, R.; MELOTO, M.; NODARI, R.O.; KELLY, J.D. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance gene in the common bean cultivar, 'G2333'. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 87-94, 1998.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 4, p. 50-63, 1978.

3 RESPOSTA DO FEIJOEIRO SUPLEMENTADO COM SILÍCIO AO ESTRESSE CAUSADO PELO FUNGO *Colletotrichum lindemuthianum*

RESUMO

Já foram descritos diversos benefícios do uso do silício em plantas e dentre eles se destaca o aumento da resistência ou tolerância a diversos patógenos, ativando a produção de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa da planta ou promovendo mudanças na anatomia da folha, resultando em células epidérmicas mais grossas ou com maior grau de lignificação. Poucos estudos relatam o efeito do silício na resposta à antracnose causada pelo fungo *C. lindemuthianum* em feijoeiro. Desta forma, o presente estudo se propõe a identificar (a) identificar a fase na qual o feijoeiro começa a absorver o silício disponível na solução nutritiva; (b) determinar o teor de silício absorvido em três variedades de feijoeiro as quais possuem diferentes graus de resistência à antracnose; (c) observar se o silício é capaz de promover mudanças morfológicas em folhas tratadas com o mineral e (d) analisar a influência do silício na atenuação da infecção da antracnose no feijoeiro. Análises de quantificação de silício, de Microscopia de varredura (MEV), de luz (ML), de Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) e avaliações de sintomas inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum*, tratadas ou não com silício foram realizadas. Com base nos resultados obtidos, foi observado que o feijoeiro mostrou-se responsivo à adição de Si no substrato, como evidenciado pela análise de teor deste elemento em folhas, em todas as variedades aqui estudadas (IAC-Harmonia, Rosinha G₂ e G2333). Através de MEV foi evidenciado que os três genótipos estudados, quando suplementados com Si, apresentaram formação de cera epicuticular. Para o experimento de atenuação da infecção do feijoeiro à antracnose, causada pela adição de Si ao substrato, avaliamos também a cultivar Pérola. Neste caso, os genótipos IAC-Harmonia e Pérola apresentaram também uma redução dos sintomas da antracnose quando as plantas foram suplementadas com Si. Através da análise por EDX também foi possível notar que o teor de Si nas folhas de feijoeiro aumentou com o suplemento de Si.

Palavras-chave: *P. vulgaris*. Antracnose. MEV. ML. EDX. Silicato de potássio. Cera epicuticular. Redução de sintomas.

RESPONSE OF COMMON BEANS SUPPLEMENTED WITH SILICON TO *C. LINDEMUTHIANUM* INFECTION

ABSTRACT

Several benefits of the use of silicon have been described in plants and among those stands the increased resistance or tolerance to various pathogens by activating the production of enzymes related to plant defense mechanisms or promoting changes in leaf anatomy, resulting in thicker epidermal cells or with a higher degree of lignification. Few studies have reported the effect of silicon in response to anthracnose caused by the fungus *C. lindemuthianum* in common bean. Thus, this study aimed to (a) identify the stage in which common bean starts to absorb the silicon available in the nutrient solution, (b) determine the silicon content absorbed in three varieties of beans which have different degrees of anthracnose resistance, (c) verify if silicon is able to promote morphological changes in leaves treated with the mineral and (d) analyze the influence of silicon on the attenuation of anthracnose symptoms. Silicon quantification, scanning microscopy (SEM), light microscopy (ML), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and evaluations of symptoms inoculated with race 65 of *C. lindemuthianum*, treated or not with silicon were performed. Based on the results obtained, it was observed that common bean shows to be responsive to the addition of Si in the substrate, as evidenced by the analysis of element content in sheets, in all varieties studied (IAC-Harmonia, Rosinha G₂ and G2333). Through SEM he showed that the three genotypes, when supplemented with Si, presented accumulation of epicuticular wax. For the experiment of attenuation of infection of bean anthracnose, caused by the addition of the Si substrate, we also evaluate the cultivar Pérola. In this case, IAC-Harmonia and also Pérola showed a reduction in symptoms of anthracnose when plants were supplemented with Si. Through analysis by EDX it was also possible to note that the Si content in leaves of common bean increased with supplementation with Si.

Key words: *P. vulgaris*. Anthracnose. MEV. ML. EDX. Potassium Silicate. Epicuticular wax. Symptoms attenuation.

3.1 INTRODUÇÃO

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na litosfera (27,7%), podendo ser encontrado em mono e dicotiledôneas em quantidades equivalentes ao fósforo e ao magnésio (FAUTEUX et al., 2005). Este elemento tem sido utilizado na forma de fertilizante em vários países (RODRIGUES et al., 2011).

Já foram descritos diversos benefícios do uso do silício em plantas como, por exemplo, melhorias nas propriedades mecânicas (estatura, penetração das raízes no solo, exposição das folhas à luz, devido a melhorias estruturais na planta), redução na transpiração, tolerância à seca e salinidade e a metais tóxicos (FAUTEUX et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011) e principalmente na composição química e enzimática da planta, alterando a resistência ou tolerância a patógenos, ativando a produção de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa da planta. Além disso, o silício tende a se polimerizar nas paredes celulares, lúmen celular, espaços intercelulares e na camada subcuticular, levando a mudanças na anatomia da folha, resultando em células epidérmicas mais grossas ou um grau maior de lignificação. Ao acumular-se nas células da camada epidérmica, esta barreira física torna-se estável e dificulta a penetração de alguns tipos de fungos (EPSTEIN, 1999).

Diversos estudos correlacionam o tratamento com silício com queda na intensidade de infecção por diferentes tipos de patógenos e em diferentes culturas como: arroz (SEEBOLD et al., 2000 e 2001); em milho (GOUSSAIN et al., 2002); em trigo (GUÉVEL; MENZIES; BÉLANGER, 2007; CHAIN et al., 2009); em tomate (GHAREEB et al., 2011) e em feijoeiro infectado pelo patógeno causador da antracnose, o *C. lindemuthianum* (MORAES et al., 2006).

Em feijoeiro ainda não se sabe o exato mecanismo de absorção de Si. Ele é geralmente encontrado nos tecidos que mais sofrem transpiração, levando a crer que o Si possa ser transportado passivamente das raízes até as folhas através do fluxo de transpiração (MA et al., 2002; RICHMOND; SUSSMAN, 2003) e que quando a água evapora, o ácido silícico se torna saturado sendo então precipitado.

Poucos estudos relatam o efeito do silício na cultura do feijoeiro. Desta forma, o presente estudo se propõe a identificar (a) a partir de que fase, o feijoeiro começa a absorver o silício disponível na solução nutritiva; (b) determinar o teor de silício absorvido em três variedades de feijoeiro; (c) observar se o silício é capaz de promover mudanças morfológicas

em folhas tratadas com o mineral e (d) analisar a influência do silício na redução de sintomas de antracnose no feijoeiro.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

Este estudo teve como objetivo observar o comportamento de diferentes cultivares de feijoeiro em resposta a inoculação com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e da adição de silício. Para isso, foram usadas em todos os experimentos, três variedades com diferente resposta a raça 65 de *C. lindemuthianum*: G 2333 que é resistente; IAC-Harmonia que é tolerante e a Rosinha G₂ que é suscetível. Neste estudo, um dos experimentos a ser realizado era a capacidade do silicato de potássio em atenuar a infecção do feijoeiro pela raça 65 de *C. lindemuthianum*. Neste caso, além das três cultivares já descritas acima, também foi avaliada a resposta da cultivar Pérola.

3.2.1.1 Determinação do teor de silício nas folhas de feijoeiro em diferentes fases de desenvolvimento da planta

No presente estudo foi conduzido um experimento em casa de vegetação visando determinar em que estágio de desenvolvimento do feijoeiro ocorre a absorção do silício, usando como fonte o mineral silicato de potássio. Três genótipos de feijoeiro foram avaliados neste experimento: IAC-Harmonia (tolerante à antracnose), Rosinha G₂ (susceptível à antracnose) e G2333 (resistente à antracnose). A resposta das plantas à raça 65 da antracnose foi aqui referida devido a sua consideração nas seções posteriores deste estudo. O experimento foi composto em blocos casualizados com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por três fatores: genótipo, presença de silicato de potássio e fase da coleta.

Sementes dos três genótipos foram pré-germinadas em papel de germinação até a emissão da radícula. Posteriormente, duas plântulas de cada genótipo foram transplantadas para vasos plásticos de 2L contendo vermiculita (média) esterilizada. Após o transplante, os

vasos foram irrigados com 1 L de solução nutritiva (JHONSON et al., 1957) contendo silicato de potássio 75 ppm e na ausência do mesmo (Tabela 3). As plantas foram irrigadas a cada dois dias com as soluções correspondentes. As coletas foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após o transplante. As folhas das plantas foram coletadas em *bulk* e em seguida levadas a uma estufa para secagem a 37°C por dois ou três dias até obtenção de peso seco constante. Nas coletas de sete dias foram retiradas as folhas primárias e nas demais coletas (14, 21 e 28 dias), o primeiro trifólio.

Tabela 3 - Composição das soluções nutritivas (JHONSON et al., 1957)

Componente	Presença de silicato de potássio	
	0 ppm de Si (mL)	75 ppm de Si (mL)
KNO ₃ 1 M	0,5	0,5
Ca(NO ₃) ₂ 2H ₂ O 1M	1,33	1,33
NH ₄ H ₂ PO ₄ 1M	1	1
Micro Nutrientes	1	1
MgSO ₄ 7H ₂ O 1M	1	1
FeEDTA	1	1
CaCl ₂ 1M	2,25	2,25
KCl 1M	1,89	0
K ₂ Si 1:1	0	1,55
Água qsp	1000	1000

Para quantificar o teor de silício em cada uma das amostras, foi utilizado o método amarelo modificado por Korndörfer; Pereira; Nolla (2004). Depois de secas, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido. Em tubos contendo 50 mg de cada material foi adicionado 1 mL de H₂O₂. Depois disso, 1,5 mL de NaOH foi adicionado e a mistura foi homogeneizada. Os tubos foram fechados e levados à autoclave por 1 hora a 123°C e 1 atm. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água destilada a cada amostra, as quais permaneceram por 12 h a 4°C. Depois deste período, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um outro tubo contendo 19 ml de água destilada.

Para a quantificação em espectrofotômetro, padrões de dosagem conhecidas de Si (0; 0,25; 0,50; 1; 2; 3 e 4 %) foram utilizados para a construção da curva padrão. Em todas as amostras (incluindo os padrões) foram adicionados 1 mL de HCl e logo em seguida, 2 mL de molibdato de amônio. Após 5 minutos, 2 mL de ácido oxálico foram adicionados e a mistura

foi então homogeneizada. Decorridos 10 minutos, fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. Uma curva de regressão foi feita para converter os valores dos padrões em porcentagem de Si. Para a determinação do teor de Si nas folhas, cada amostra foi avaliada em duplicata. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

3.2.1.2 Determinação do teor de silício nas folhas de feijoeiro em três diferentes variedades de feijoeiro

Para quantificar o teor de silício nas folhas de feijoeiro das três variedades (IAC-Harmonia, Rosinha G₂ e G2333), as plantas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo que as descritas no experimento anterior, com a diferença que as coletas das folhas em bulk foram realizadas aos 21 dias após o transplante. Para a determinação do teor de Si nas folhas, a metodologia utilizada foi a mesma descrita no ítem anterior. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

3.2.1.3 Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de luz (MO) e EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy).

O primeiro experimento tinha como objetivo identificar se existiam diferenças morfológicas (número de estômatos; número e tipo de tricomas) entre os genótipos de feijoeiro através de análises de microscopia de varredura - MEV. Para isso, Seis plantas de cada genótipo foram plantadas em vasos contendo terra e irrigadas diariamente até o 10^o dia após o transplante onde foram feitas as coletas. Três discos foliares foram coletados de cada amostra. Logo após a coleta, as amostras foram fixadas em solução *Karnovsky* modificado (1965) [(glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio (0,05M PH 7,2)] durante 48 horas sendo em seguida desidratadas em série etílica crescente (35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,) por 15 minutos, seguidas de 3 trocas em etanol 100% durante 20 minutos. A secagem ao ponto crítico foi feita utilizando CO₂ líquido, e a seguir foram montadas em suportes metálicos. Em seguida, as amostras foram metalizadas durante 180 segundos. A observação e captação das imagens foram

realizadas no equipamento MEV (Zeiss LEO-VP 435), no NAP/MEPA da ESALQ/USP. As contagens dos tricomas e estômatos foram feitas em um quadrante de oito cm².

Em um segundo ensaio foi avaliado se a adição do silicato de potássio era capaz de promover mudanças estruturais e/ou morfológicas nos genótipos. Para isso, foram realizadas análises de MEV e de EDX (para a quantificação do teor de silício absorvido pela planta).

Por se tratar de um elemento não essencial para as plantas, a absorção de silício só acontece quando a planta sofre algum tipo de estresse. Sendo assim, os três genótipos foram submetidos a três diferentes tratamentos: crescidos em solução nutritiva contendo 75 ppm de Si e inoculadas com o patógeno; crescidas em solução nutritiva sem silício e inoculadas com o patógeno e crescidas em solução nutritiva sem adição de silício e não inoculadas com o patógeno. Neste caso, seis plantas de cada um dos genótipos foram inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum* no laboratório do Centro de grãos e fibras do IAC em Campinas. Para os três tratamentos, a coleta foi realizada 72 h após a inoculação.

Para o MEV foram coletadas seis amostras de cada tratamento e a metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente. Para o EDX a cobertura com ouro foi feita em metalizador Bal-tec SCD 050 (Liechtenstein), a 40 milliamperes por 120 segundos, e a cobertura com carbono em metalizador Denton Vacuum Desk II (Moorestown, NJ, USA). A captação das imagens foi feita no equipamento Scanning electron Microscopy-JSM 5600LV da Jeol e a leitura dos dados no EDX Vantage da Noran, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP). Para o EDX, três fragmentos de folhas e duas repetições técnicas de cada tratamento foram realizados. Neste experimento, as amostras inoculadas com o patógeno na ausência de silício não foram avaliadas, pois o material foi insuficiente.

Nas análises de MO, quatro amostras de tecidos foliares com cerca de 2 mm de comprimento foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) [(glutaraldeído 2% , paraformaldeído 2%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio (0,05M PH 7,2)] durante 48 horas, sendo em seguida lavadas em tampão cacodilato 0,1M e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após rápidas lavagens com solução salina 0,9% foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5% em água e desidratadas em séries crescentes de acetona em água (25%,50%,75%) por 5 minutos cada, seguidas por 2 tratamentos de 10 minutos cada com acetona 90% e 3 tratamentos de 20 minutos com acetona pura. A infiltração e emblocagem foram realizadas em resina Spurr conforme recomendação do fabricante.

Quatro secções semifinas (200nm) de cada amostra foram depositadas sobre lâminas de vidro, e coradas com azul de toluidina 2,0% em solução de bórax 1% durante 8 minutos e lavadas em água destilada. As lâminas foram montadas utilizando resina *Entelan*®. Depois de geradas as imagens de cada uma das quatro amostras, dez medições foram feitas através do software *Image J* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para todos estes experimentos, as análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

3.2.1.4 Teste de verificação da raça do patógeno

Para confirmar a viabilidade e a raça do patógeno usado no estudo, 20 sementes de cada variedade diferenciadora (CIAT, 1990) foram germinadas em papel de germinação conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram transplantadas em bandejas contendo vermiculita média onde 6 plantas de cada genótipo foram dispostas em fileira e após 7 dias, foram levadas a câmara de inoculação do Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O isolado referente a raça 65 de *C. lindemuthianum* utilizado neste estudo, foi gentilmente cedido pela EMBRAPA Arroz e Feijão. O isolamento do fungo e a sua multiplicação foram realizados segundo metodologia descrita por Figueiredo (1967) no Centro de Fitossanidade do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). As duas bandejas foram inoculadas com uma suspensão de $1,2 \times 10^6$ conídios/mL da raça 65 de *C. lindemuthianum* (Figura 4). A incubação foi realizada em sala climatizada, com temperatura de 20°C (± 2 °C) e umidade relativa de $\pm 90\%$, por um período de 48 h. Após uma semana, os sintomas da doença foram avaliados seguindo a escala de notas descritas pelo CIAT (1990) e Balardin et al., (1997). Segundo esta escala, a nota 1 equivale a planta sem sintomas (resistente); a nota 3 equivale a plantas que possuem pequenas lesões, geralmente nas folhas primárias (resistentes) e notas de 5 a 9 equivalem grandes lesões dos dois lados da folha e lesões também no hipocótilo (suscetível). Depois de aferidas as notas, a classificação da raça é feita com base nas variedades afetadas pelo patógeno seguindo normas descritas pelo CIAT (1990).

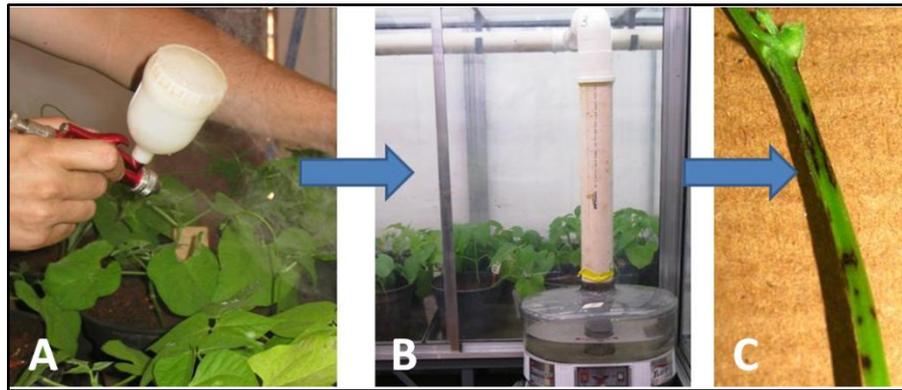


Figura 4 - Esquema da inoculação de *C. lindemuthianum* em feijoeiro. Inoculação do patógeno (A); Incubação em câmara úmida por 48 h (B) e avaliação dos sintomas após uma semana (C)

3.2.1.5 Verificação da atenuação da infecção por *C. lindemuthianum* pelo silicato de potássio

Para determinar se o silicato absorvido pela planta seria capaz de gerar uma atenuação da infecção da antracnose em folhas de feijoeiro, quatro variedades com respostas contrastantes para a infecção com a raça 65 do patógeno foram selecionadas: G2333 (resistente), IAC-Harmonia (tolerante), e Rosinha G₂ e Pérola (suscetíveis), foram usadas. As plântulas foram transplantadas em caixas contendo cinco plântulas por variedade. Depois de transplantadas, foram irrigadas durante 15 dias com solução nutritiva contendo ou não 75 ppm de silicato de potássio. Depois deste período, as plantas foram levadas ao Centro de Grãos e Fibras do IAC onde foram inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e os sintomas foram avaliados sete dias após a inoculação da mesma forma como descrito anteriormente. Este experimento foi realizado em blocos casualizados com três repetições. As notas foram convertidas através da fórmula $\sqrt{x} + 1$ e em seguida, as análises estatísticas foram feitas através do programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Absorção de silício em diferentes fases do desenvolvimento do feijoeiro

Nenhum trabalho publicado até o momento elucidou em que estágio de desenvolvimento o feijoeiro passa a absorver silício e se a absorção difere entre genótipos para esta cultura. Essas informações são extremamente importantes para realizar ensaios de inoculação de patógeno (*C. lindemuthianum*) e verificar se este estresse apresenta algum efeito na absorção de silício. A metodologia de inoculação e de avaliação da doença é mais eficiente em plantas jovens, principalmente devido à facilidade de avaliação.

As análises de absorção temporal do silício nos genótipos Rosinha G₂, IAC-Harmonia e G2333 indicaram que o silício começa a ser absorvido após 14 dias de tratamento com o mineral contando a partir do transplante (Figura 5).

Os resultados também indicaram maior absorção de Si pelo genótipo tolerante (IAC-Harmonia: 1,16%) e suscetível (Rosinha G₂: 1,50%) aos 28 dias, em comparação ao genótipo resistente (G2333: 1,13%), mostrando uma tendência maior de absorção do suscetível em relação aos demais.

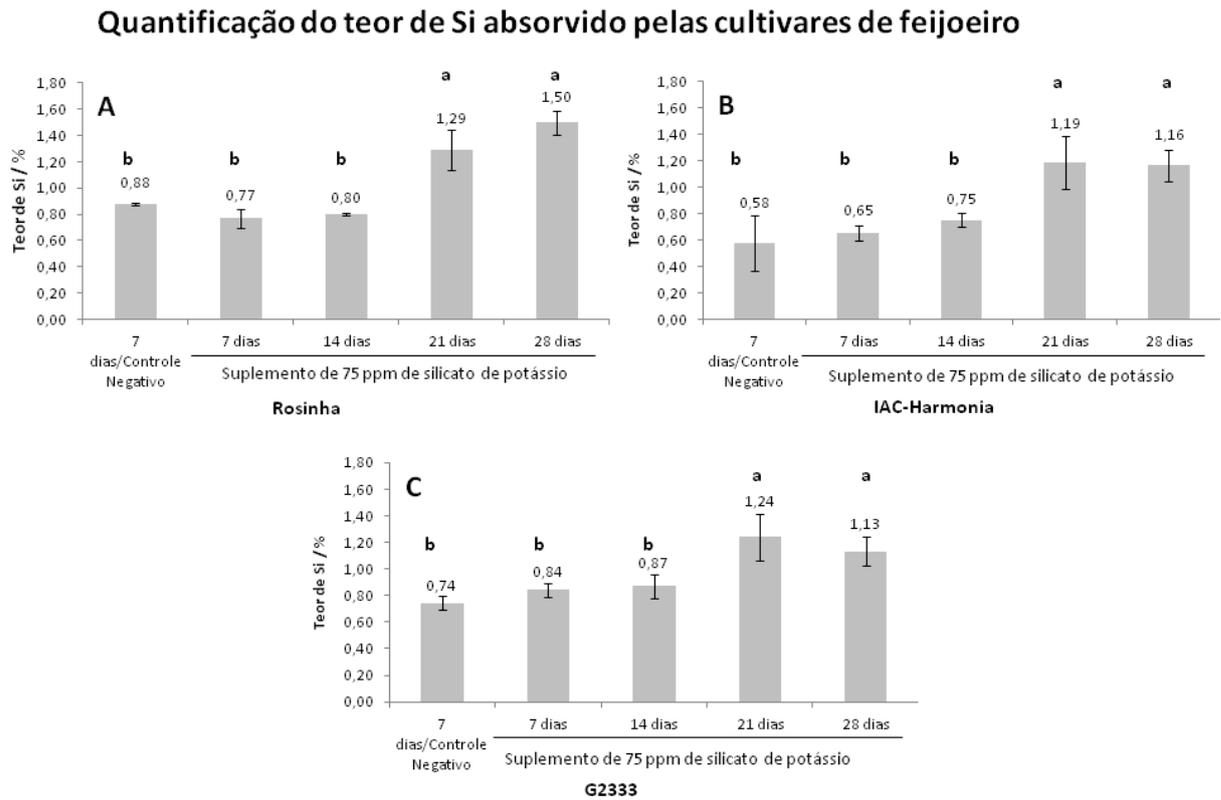


Figura 5 - Análises de absorção temporal do silício nos genótipos Rosinha G₂, IAC-Harmonia e G2333. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

Usando a mesma metodologia, Oliveira (2009) observou que mesmo nas espécies não acumuladoras de Si, como feijão e soja, a concentração de Si aumentou pela adição do elemento na solução nutritiva. As plantas de feijoeiro absorveram prontamente o Si disponível na solução nutritiva, com uma extração de 72% do total disponível na primeira semana do cultivo. Aos 60 dias, este valor chegou a 15%, mostrando que para esta cultura a absorção de Si ocorre de forma mais intensa nos primeiros dias de desenvolvimento da planta. Estes resultados são compatíveis com o presente estudo no que diz respeito à absorção temporal do elemento. Análises e variações no teor de Si ao longo do ciclo do feijoeiro não foram realizadas, tendo em vista os objetivos a serem alcançados.

3.3.2 Absorção diferencial de silício entre genótipos de feijoeiro

Este experimento constituiu a base para investigar se os genótipos efetivamente absorviam silício de forma diferencial, pois assim poderiam ser realizados os ensaios de remediação da doença e posteriores análises moleculares como a construção da biblioteca SSH e os estudos de RT-qPCR.

Com base nos resultados (Figura 6), podemos observar que todos os genótipos avaliados absorveram e depositaram mais Si em seus tecidos quando tratados com 75 ppm de silicato de potássio. No entanto, os valores de absorção foram similares entre os genótipos. Apesar disso, podemos notar que o tratamento com silício incorre em maior absorção do elemento e a mesma é similar entre os genótipos avaliados em relação ao tratamento controle. Outros trabalhos, no entanto, mostraram absorção diferencial entre genótipos. A cultivar Aporé foi a que mais se beneficiou da absorção deste mineral em comparação com outros genótipos (BRS Talismã e Pérola) em estudo similar realizado por Teixeira et al., (2008).

Em outras espécies resultados semelhantes foram reportados. Ma e colaboradores (2007) observaram diferença na absorção de silício entre duas variedades de arroz, Nipponbare (Japônica) e a Kasalath (Índica). Segundo os autores, os resultados podem ser associados à diferença na habilidade da obtenção do Si pelas raízes, uma vez que através de estudos de RT-qPCR os genes *Lsi1* e *Lsi2*, transportadores de silício, mostraram ser mais expressos em Nipponbare do que em Kasalath. Ainda em arroz, Seebold et al., (2000) indicaram que a cultivar, Santa Rosa, absorveu cerca de 41% a mais que a mesma cultivar submetida a tratamento sem silicato. Também em soja, diferenças de absorção de Si entre genótipos foram encontradas (ARSENAULT-LABRECQUE et al., 2012). A resposta diferencial à absorção de Si, reportada em diferentes culturas mostra a importância deste tipo de experimento, uma vez que plantas que absorvem mais Si podem apresentar uma melhor estabilidade a diferentes tipos de estresse.

Quantificação do teor de Si absorvido pelas cultivares de feijoeiro aos 21 dias

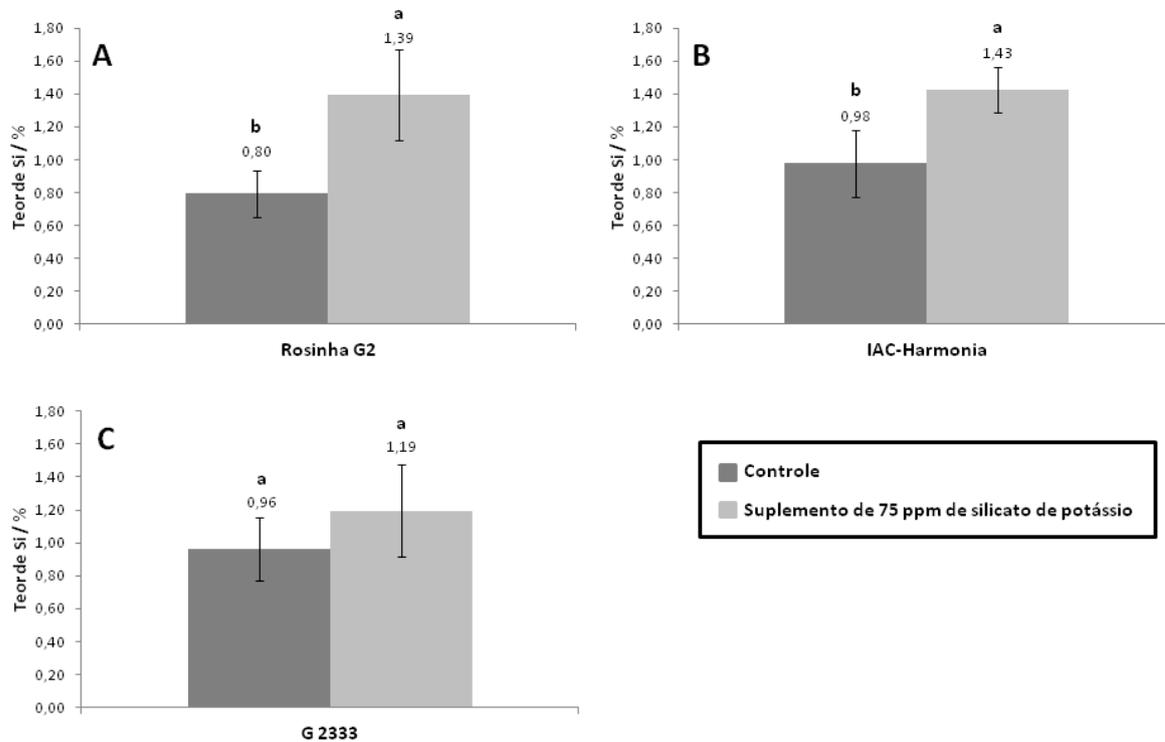


Figura 6 – Análises de teor de Si nas variedades de feijoeiro Rosinha G₂, IAC-Harmonia e G2333, aos 21 dias após a germinação. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

3.3.3 Modificações morfológicas e/ou estruturais em folhas tratadas com silício

3.3.3.1 Análises de folhas não tratadas com silício

Nessa abordagem, análises de *MEV* visaram verificar se existiam diferenças morfológicas no tipo e números de tricomas e estômatos presentes nos genótipos com diferentes respostas à antracnose (Figura 7).

Neste trabalho foram encontrados dois tipos de tricomas, os unciformes e os glandulares. A presença destes dois tipos de tricomas em feijoeiro também foi observado por Stenglein et al., (2004) e Paron; Lara, (2005).

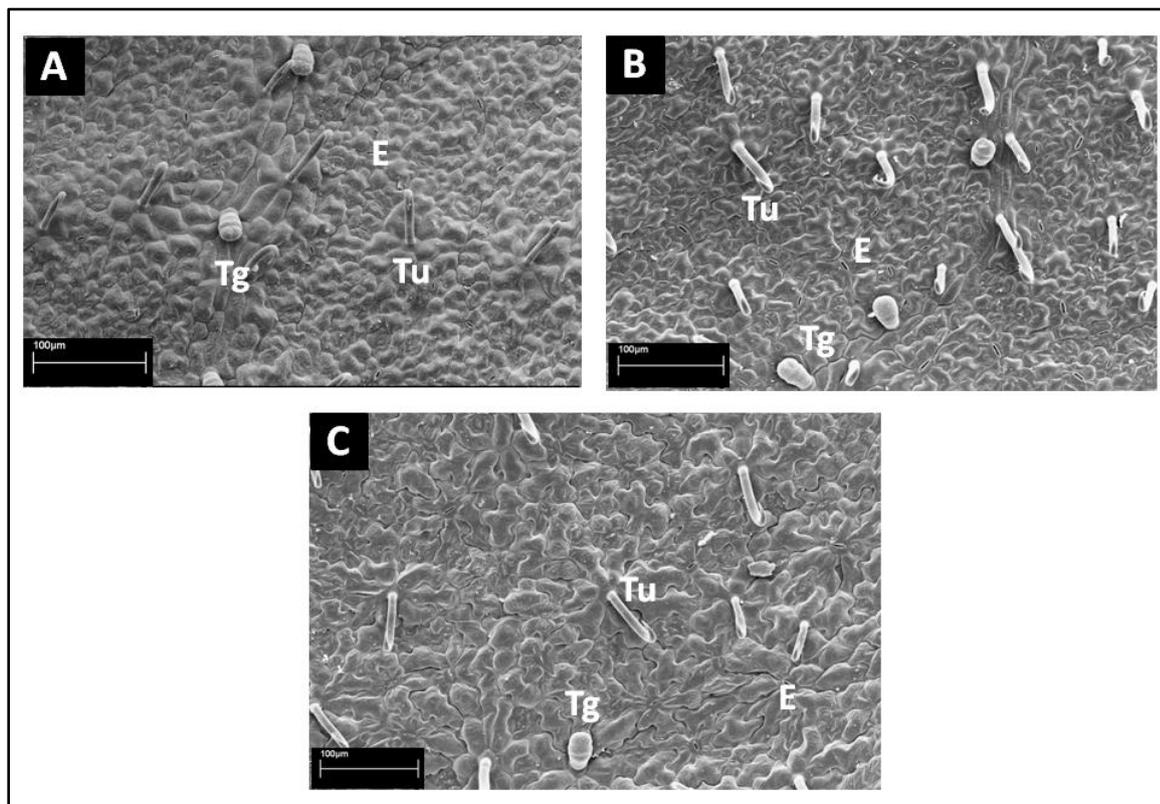


Figura 7 - Microscopia de varredura da superfície adaxial de folhas de feijoeiro. Genótipos: G2333 (A); IAC-Harmonia (B) e Rosinha G₂ (C). Estômatos (E), tricomas unciformes (Tu), tricomas glandulares (Tg). As barras das figuras representam comprimento de 100 µm e o aumento de 200X

Alguns autores associam este fato à resistência conhecida como passiva onde estas estruturas podem contribuir para a redução da adesão, infecção, colonização, crescimento e multiplicação de patógenos. Aparentemente superfícies foliares ausentes ou com poucos tricomas, podem estar desprotegidas da colonização e infecção por fungos (STENGLEIN et al., 2004; STENGLEIN et al., 2005). Park et al., (1994) relatam que em feijoeiro, os tricomas unciformes funcionam como um mecanismo de defesa da planta contra insetos e fungos e que uma grande variabilidade existe quanto ao número de tricomas por variedade. Diversos trabalhos relatam a relação entre número e tipos de tricomas com a redução de infecção por patógenos (PARON; LARA, 2005 e ORIANI et al., 2005) e também para a seca (DAHLIN; BRICK; OGG, 1992).

Apesar disso, no presente trabalho, não houve diferença significativa no número e no tipo dessas estruturas nas variedades de feijoeiro contrastantes para a resposta a antracnose (Figura 8). Os genótipos não diferiram estatisticamente para o número de tricomas, o que contrasta com outros trabalhos (DAHLIN; BRICK; OGG, 1992).

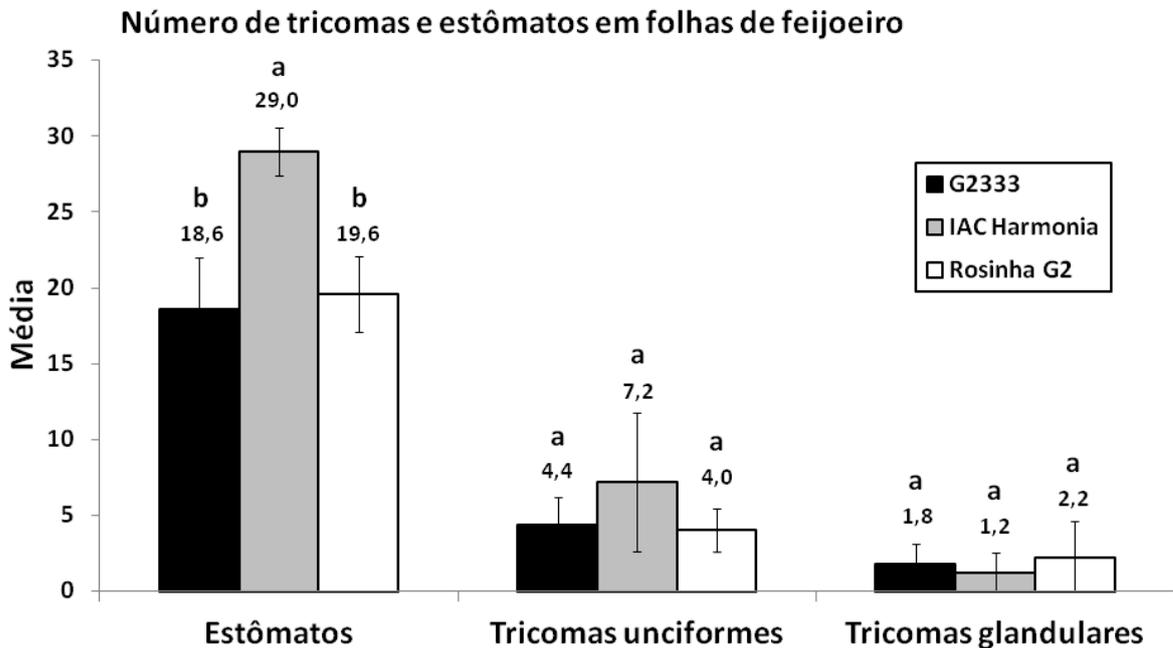


Figura 8 - Médias das contagens de estômatos e tricomas da superfície adaxial de folhas de feijoeiro dos genótipos G2333, IAC-Harmonia, e Rosinha G₂. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

No presente estudo, foi possível observar uma diferença estatística para o número de estômatos entre as variedades com destaque para a cultivar IAC-Harmonia (Figura 8) que apresentou uma média de 29 estômatos em relação aos demais (Rosinha G₂ com cerca de 20 e G2333 com 19). Já foi evidenciado que os estômatos são importantes sítios de entrada de patógenos que infectam e colonizam plantas (STENGLEIN et al., 2004; STENGLEIN et al., 2005). STENGLEIN et al., (2005), estudaram as características da epiderme de folhas de 11 diferentes acessos de *P. vulgaris var. aborigineus* e encontraram diferenças quanto ao número de estômatos. Os autores explicam isso do ponto de vista adaptativo, em que acessos originados em diferentes altitudes apresentam este tipo de diferenças genotípicas.

3.3.3.2 Análises de folhas tratadas com silício

No segundo experimento, teve-se por objetivo avaliar se a adição do silicato de potássio promovia alguma modificação na morfologia e/ou estrutura da planta. Na Figura 9 é mostrada a superfície de folhas de feijoeiro de plantas que foram submetidas à três

tratamentos: plantas inoculadas com Si; plantas inoculadas e não tratadas com Si; e plantas não-inoculadas e sem adição de Si.

Como esperado, na ausência de Si e inóculo, a superfície foliar permaneceu sadia e sem a presença de *C. lindemuthianum*. Contrariamente, na presença de inóculo, observaram-se elevado número de hifas. Essa colonização fica evidente nos três genótipos avaliados, independentemente do tipo de resposta à antracnose de cada um deles. Em diversas imagens analisadas, a infecção pelo fungo foi constante e severa. As estruturas de infecção podem ser observadas detalhadamente na Figura 10. Estruturas como as vesículas de infecção e as hifas primárias não puderam ser observadas através de MEV.

Também em feijoeiro infectado com *C. lindemuthianum*, Ishikawa et al., (2010) visualizaram a formação de tubos de germinação e apressórios já após 24 h de inoculação nas cultivares Pérola e G2333. Os autores verificaram que após 48 h foi possível identificar a formação de hifas, em ambas cultivares. A presença do apressório é importante para a penetração do patógeno e subsequentemente, a infecção e desenvolvimento da doença.

É preponderante frisar que uma característica visualizada através deste estudo foi a presença de cera epicuticular na superfície foliar dos três genótipos avaliados, mas somente quando tratados com silício (Figura 11). Estudos anteriores já relacionaram a formação de cera epicuticular a tratamentos com diferentes tipos de silicatos, no entanto, este resultado foi primeiramente reportado para o feijoeiro no presente estudo. No trabalho de Moraes et al., (2006), com feijoeiro, em que foram usadas duas fontes de silício (silicato de sódio e silicato de cálcio), não foi detectada cera epicuticular tanto na superfície abaxial quanto na adaxial das plantas tratadas.

Alguns trabalhos com outras espécies associam a presença desta cera a uma diminuição na severidade da doença, uma vez que esta inibe a adesão do fungo e conseqüentemente a sua germinação e colonização (STENGLIN ET AL., 2005; BARTHOLOTT; NEINHUIS, 1997).

A presença de cera epicuticular também foi relatada em estudos do efeito do Si no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. Por meio de MEV, observou-se a presença de uma cutícula mais espessa na superfície abaxial da folha das plantas tratadas com Si (CaSiO_3), principalmente devido à camada de cera epicuticular mais desenvolvida. Esta camada pode ter tornado a superfície mais hidrofóbica, impedindo a formação do filme de água, importante para os processos vitais da patogênese como a germinação e a penetração, além de permitir o acúmulo de substâncias antifúngicas na cutícula (POZZA et al., 2004).

Morangueiros suplementados com 1 gL^{-1} de três diferentes fontes de silício (silicato de cálcio, silicato de sódio e silicato de potássio) também apresentaram formação de cera epicuticular, enquanto as testemunhas não a acumularam (BRAGA et al., 2009).

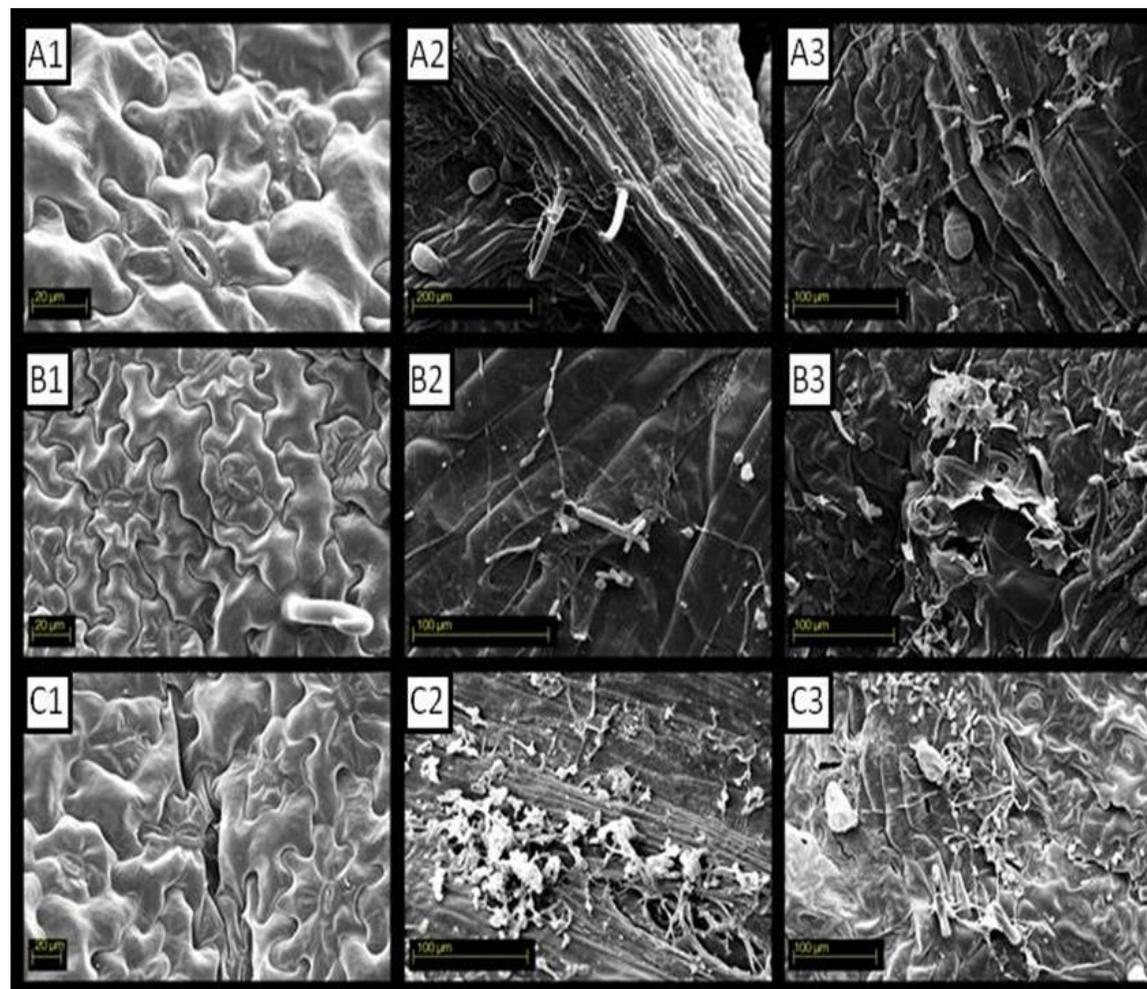


Figura 9 - MEV de folhas de feijoeiro tratadas com silicato de potássio e inoculadas com *C. lindemuthianum*. Linhas (A), genótipo G2333; (B), IAC-Harmonia; (C), Rosinha G2. Colunas (1), controle; (2), inoculação com o patógeno; (3), inoculação com o patógeno e tratamento com Si

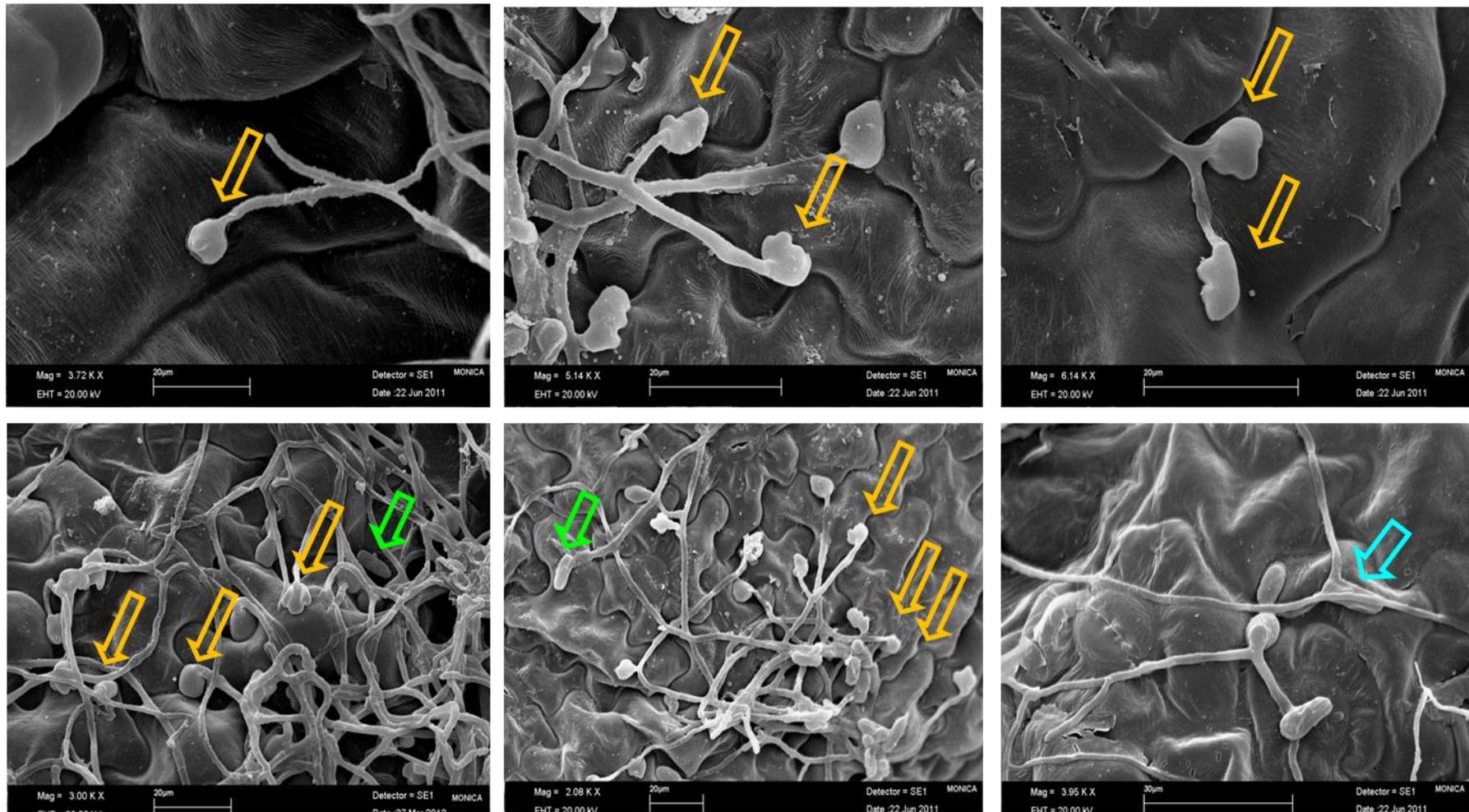


Figura 10. MEV de folhas de feijoeiro inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum*. Destaque para os mecanismos de infecção – Apressório (seta laranja); Esporo germinado (seta azul) e Esporo não germinado (seta verde)

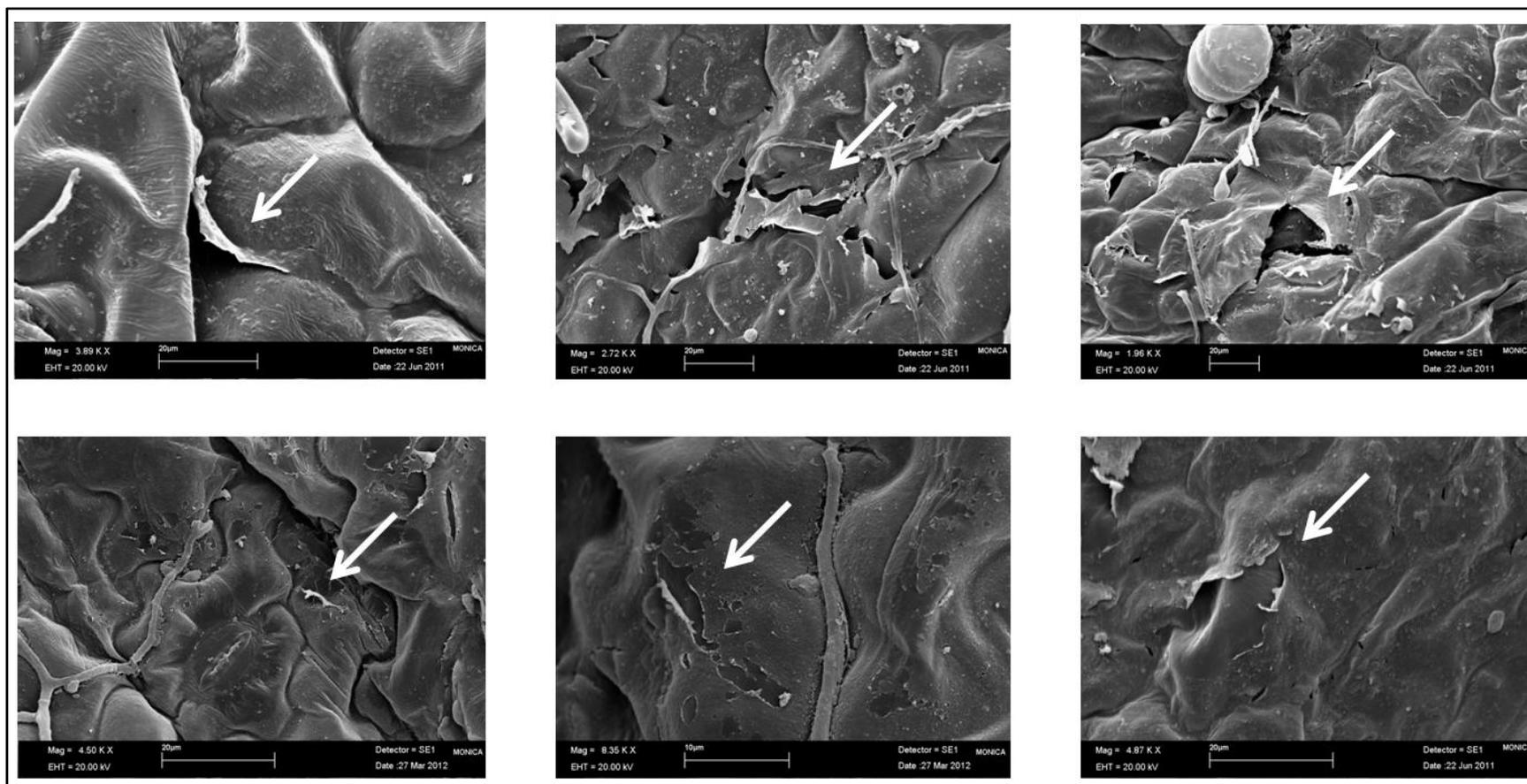


Figura 11 - MEV de folhas de feijoeiro tratadas com silicato de potássio e inoculadas com *C. lindemuthianum*. Genótipos: Rosinha G₂ (coluna 1); IAC-Harmonia (coluna 2) e G2333 (coluna 3). Seta indica formação de Cera epicuticular

3.3.3.3 Verificação da atenuação da infecção por *C. lindemuthianum* pelo silicato de potássio

A proposta de utilizar um indutor de resistência a doenças no feijoeiro é de grande importância e o silício indica ser promissor neste aspecto. Diversos trabalhos relatam o uso de adubos silicatados na indução da resposta de defesa da planta. Até o momento, duas hipóteses são aceitas. A primeira é que este mineral é capaz de induzir os genes de defesa da planta e a segunda é de que por se depositar nas folhas acaba por aumentar a espessura da epiderme foliar.

Para avaliar se o silício seria capaz de atenuar os sintomas da antracnose, quatro variedades de feijoeiro (IAC-Harmonia; Pérola; G2333 e Rosinha G₂) foram inoculadas com a raça 65 do patógeno. Após sete dias as notas foram aferidas de acordo com a metodologia descrita por CIAT (1990).

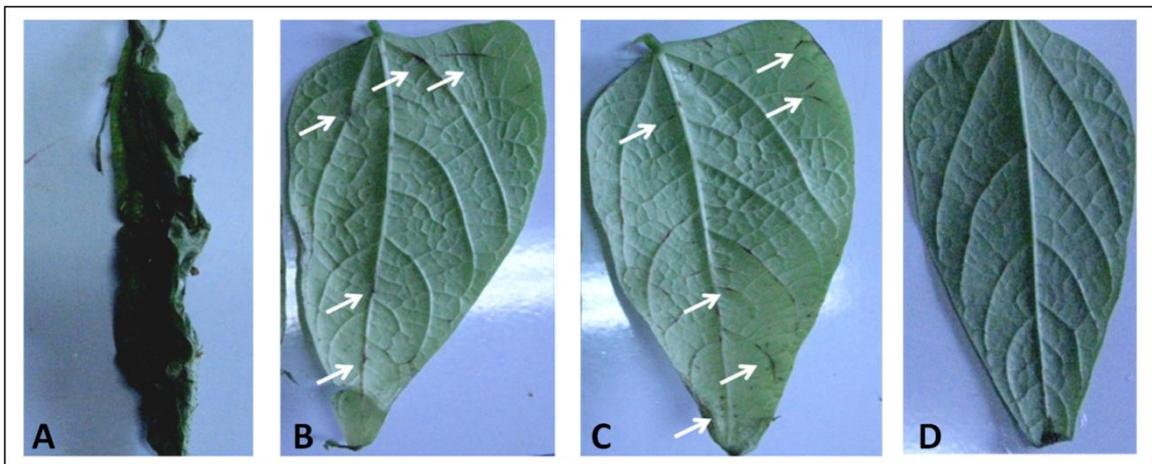


Figura 12 – Sintomas apresentados pelas plantas de feijoeiro inoculadas com *C. lindemuthianum*. Genótipos: Rosinha G₂ (A); IAC-Harmonia (B); Pérola (C); G2333 (D). As setas indicam as lesões causadas pela doença

Na Figura 12 podemos observar o padrão de resposta das cultivares avaliadas no experimento. A cultivar Rosinha G₂ (A), é tão suscetível ao patógeno que após uma semana de infecção, as folhas já estão totalmente necrosadas o que não ocorre com o genótipo resistente G2333 (D) que possui folhas livres de qualquer indício de infecção. Para os genótipos IAC-Harmonia (B) e Pérola (C), é possível identificar diversos indícios de infecção (setas). Vale ainda destacar, a maior severidade dos sintomas nas nervuras.

A partir das análises das notas, apenas os genótipos IAC-Harmonia (tolerante) e Pérola (suscetível) diferiram para os tratamentos (plantas inoculadas com 75 ppm de silicato de potássio *versus* plantas inoculadas sem adição de Si), apresentando uma redução da nota de infecção (Figura 13).

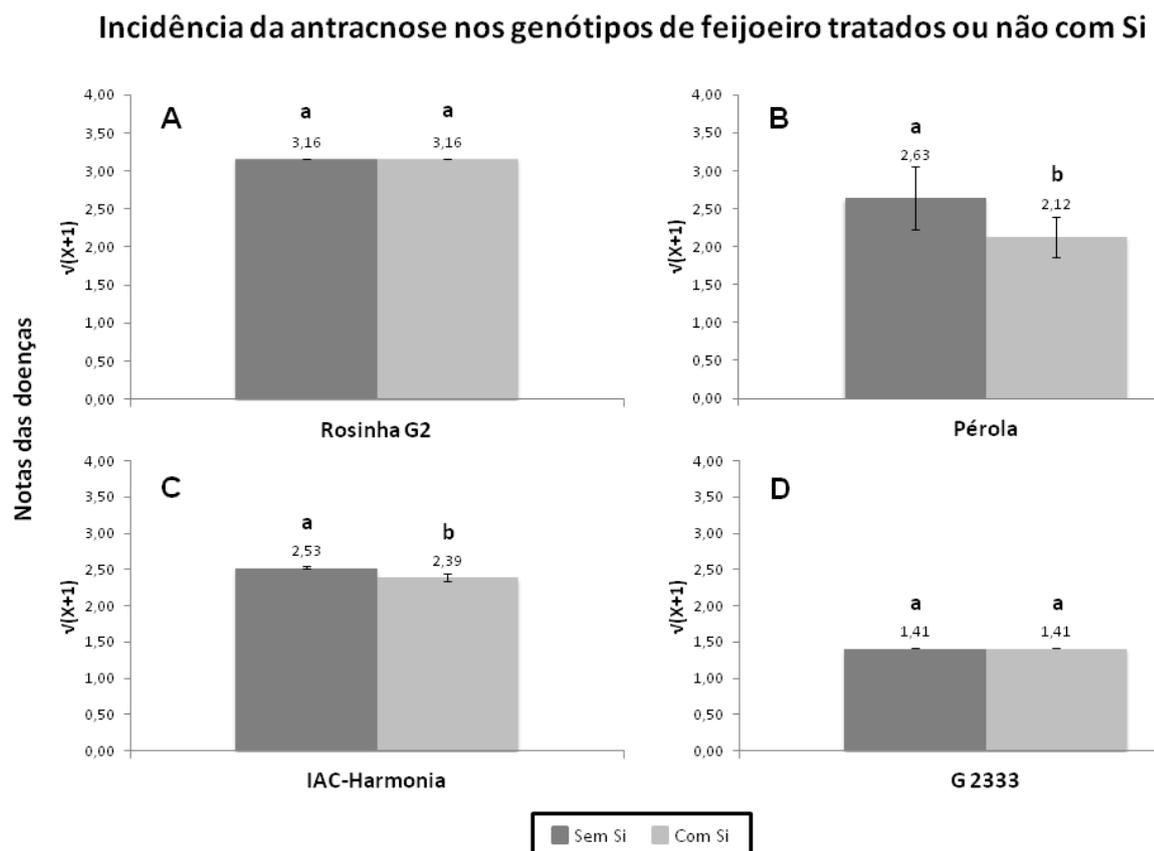


Figura 13 - Resultados da avaliação de diferentes genótipos de feijoeiro ao tratamento ou não com 75ppm de silicato de potássio. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

Conforme anteriormente discutido, as variedades IAC-Harmonia, Rosinha G₂ e G2333 absorvem silício em seus tecidos e acumulam cera epicuticular na presença de Si. Relatos da literatura indicam que as variedades tolerantes e suscetíveis são as que mais se beneficiam com a aplicação deste mineral (SEEBOLD et al., 2001). Entretanto, o genótipo Rosinha G₂ é tão suscetível ao patógeno que a sua nota é a mais baixa na escala. Desta forma, sozinho, o silício mostra-se ineficaz na remediação da doença em cultivares altamente suscetíveis. E para a variedade G2333 que possui a maior resistência, o uso de silício torna-se desnecessário, visto que a planta não sofre danos.

Outros trabalhos mostraram a remediação pelo uso de fontes de silício. Teixeira et al., (2008) avaliaram três diferentes formas de aplicação foliar de silicato (Rocksil, 30g L⁻¹; Saborsil AC77, 20 g L⁻¹ e Silicato de Potássio; 30 g L⁻¹) aos 45, 60 e 75 dias após a emergência e na resposta a duas variedades de feijoeiro (Pérola e Aporé). Os autores afirmam que as três fontes foram capazes de suavizar os sintomas de mancha angular e antracnose em relação aos sintomas apresentados pelas testemunhas não tratadas com as fontes de silicato.

Ainda, avaliando a interação entre antracnose e a variedade de feijoeiro Carioca Comum, Moraes et al., (2006), também observaram efeito positivo na redução dos sintomas da raça 81 de *C. lindemuthianum*. Neste estudo, a área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) foi avaliada entre os tratamentos e as testemunhas. Os autores ressaltaram que a maior dose de silicato de cálcio usada (1,89 g kg⁻¹) foi a que apresentou menor índice da doença. Além disso, os resultados demonstraram que quanto maior a dose de silicato de cálcio usada, maior foi a concentração de Si nas folhas. Desta forma, os autores afirmaram que, provavelmente, a aplicação de doses superiores às utilizadas poderia reduzir ainda mais a incidência da antracnose em feijoeiro. No entanto, o modo de ação do Si no controle da antracnose do feijoeiro ainda não foi elucidado, sendo que o presente trabalho apresenta os primeiros indícios de que o acúmulo de cera pode estar relacionado a esta característica.

Resultados semelhantes também foram encontrados em plantas de arroz infectadas com brusone, causada pelo fungo *Pyricularia oryzae*. Quatro diferentes cultivares de arroz foram avaliadas e segundo os autores, houve uma redução significativa no número de esporos, no tamanho das lesões e na área foliar afetada. A quantidade de doença das plantas parcialmente resistentes, na presença de Si, apresentaram respostas que as tornaram fenotipicamente similares às plantas resistentes que cresceram em solos não supridos do elemento. Os autores afirmam ainda que o Si é de extrema importância na remediação da doença, principalmente em variedades parcialmente resistentes e suscetíveis (SEEBOLD et al., 2001).

Ainda em arroz, a concentração de 2 mM de silício foi suficiente para diminuir significativamente os índices de incidência de *Magnaporthe grisea* em plantas tratadas em relação as testemunhas. Neste caso, o patógeno foi usado como indutor da absorção do Si uma vez que, plantas não-inoculadas e tratadas com Si não diferiram na atividade da Peroxidase (POD), Polifenol oxidase (PPO), Fenilalanina amônia liase (PAL) e teor de lignina. Já quando as plantas foram inoculadas e tratadas com Si, a atividade destas enzimas aumentou em relação à testemunha. Os resultados indicaram que quanto menor o índice da doença, maiores

foram as atividades destas enzimas tanto na cultivar suscetível quanto na resistente (CAI et al., 2008). Também em cafeeiros infectados por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, doses maiores foram mais eficientes no controle da doença (POZZA et al., 2004).

Resultados positivos para remediação através do uso de silicatos nem sempre foram encontrados. Em diferentes genótipos de soja infectados com *Phakopsora pachyrhizi* e tratadas com 0,4 mM de silício solúvel, por exemplo, não foram observadas reduções nos sintomas causados pela ferrugem (ARSENAULT-LABRECQUE et al., 2012). Em arroz tratado com Si, este tipo de resposta também foi observado e os autores sugerem que como não houve redução na severidade da doença, deve existir um limite de Si necessário para aumentar a resistência do hospedeiro (KIM et al., 2002).

Resumidamente, para a raça 65 de *C. lindemuthianum*, os genótipos tolerantes IAC-Harmonia e Pérola foram beneficiados pelo uso de Si, levando a uma redução significativa na severidade da doença. Isso sugere que um adubo silicatado pode ser usado na diminuição da severidade de doenças como a antracnose, em condições de campo, quando usadas cultivares que apresentam algum grau de resistência a *C. lindemuthianum*.

3.3.3.4 Alterações na espessura da epiderme

O silício tende a se polimerizar nas paredes celulares, lúmen celular, espaços intercelulares e na camada subcuticular, levando a mudanças na anatomia, como camadas de células epidérmicas mais espessas ou um grau maior de lignificação. Ao acumular-se nas células da camada epidérmica, esta barreira física torna-se estável e dificulta a penetração de alguns tipos de fungos (EPSTEIN, 1999).

Kim et al., (2002) avaliaram através de microscopia eletrônica e de microanálises de raio-X, a localização e acumulação do silício em folhas de arroz. Para isso, escolheram uma cultivar suscetível (Jinmi) e uma resistente (Hwaseong) crescidas em soluções hidropônicas contendo entre 0 a 200 ppm de silício. Na cultivar Jinmi, a acumulação e o espessamento da epiderme da parede celular foi maior em relação às encontradas em Hwaseong. O espessamento na epiderme da parede celular não apresentou relação com o aumento da concentração do mineral na solução nutritiva.

Para verificar se este padrão também ocorreria em feijoeiro, três variedades foram avaliadas. Para o silício ser absorvido de forma mais eficiente, relatos na literatura sugerem

que existe a necessidade de se induzir algum tipo de estresse nas amostras. Desta forma, os tratamentos constituíram de: genótipos G2333, Rosinha G₂ e IAC-Harmonia inoculados com a raça 65 de *C. lindemuthianum* regados com 75 ppm de Si; os três genótipos inoculados na ausência de 75 ppm de Si e os três genótipos não-inoculados.

Os dados anteriores de absorção de Si mostraram que houve diferença significativa na absorção de Si pelas variedades tratadas com este mineral em relação às controles. Além disso, os dados indicaram que a variedade Rosinha G₂ e a IAC-Harmonia foram as que mais absorveram este mineral e que o tratamento com Si foi capaz de induzir a produção de cera epicuticular nas folhas das três variedades.

Como uma das hipóteses é que o Si induza ao espessamento da parede celular da epiderme e, portanto, a epiderme deve apresentar maior espessura, este resultado também seria esperado para as três variedades de feijão. Entretanto, podemos observar que o tratamento com 75 ppm de silicato de potássio não diferiu estatisticamente do controle, nas três cultivares analisadas (Figura 14). Desse modo, um método de coloração de parede celular e posterior aferição de medidas poderia ser mais indicado para este fim.

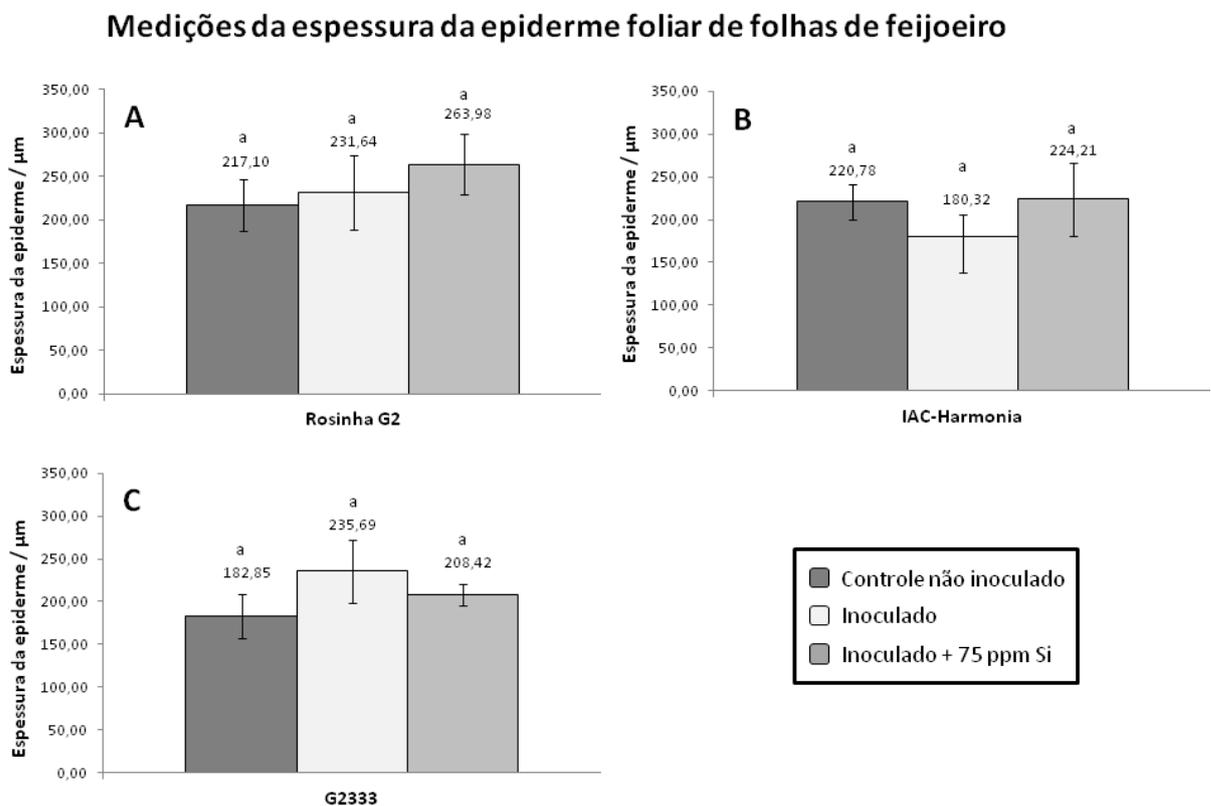


Figura 14 - Resultados da avaliação da espessura da epiderme em diferentes genótipos de feijoeiro em resposta

ao inóculo e tratamento com 75 ppm de silicato de potássio. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

Desse modo, a dose usada de 75 ppm de silicato de potássio, apesar de mostrar outros tipos de alterações (formação de cera epicuticular e atenuação dos sintomas da doença), não foi suficiente para promover um aumento significativo na espessura da epiderme dos feijoeiros IAC-Harmonia e G2333. Dessa forma, outros testes de dosagem e inclusive até de fonte de silício e outros genótipos poderiam ser realizados para verificar este tipo de resposta em feijoeiro.

3.3.3.5 Determinação de silício através de Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

O experimento para análise *EDX* foi realizado com plantas dos genótipos G2333, IAC-Harmonia e Rosinha G₂, inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum* e tratadas com solução nutritiva contendo 75 ppm de silicato de potássio e plantas não-inoculadas e tratadas com solução nutritiva sem a adição do silicato de potássio. As leituras do EDX foram feitas em três amostras biológicas e duas técnicas para cada amostra.

Os resultados obtidos por este método estão em concordância com os obtidos pelo método amarelo (KORNDÖRFER; PEREIRA; NOLLA, 2004), visto que as plantas tratadas com silício também apresentaram maior teor do mineral (Figura 15).

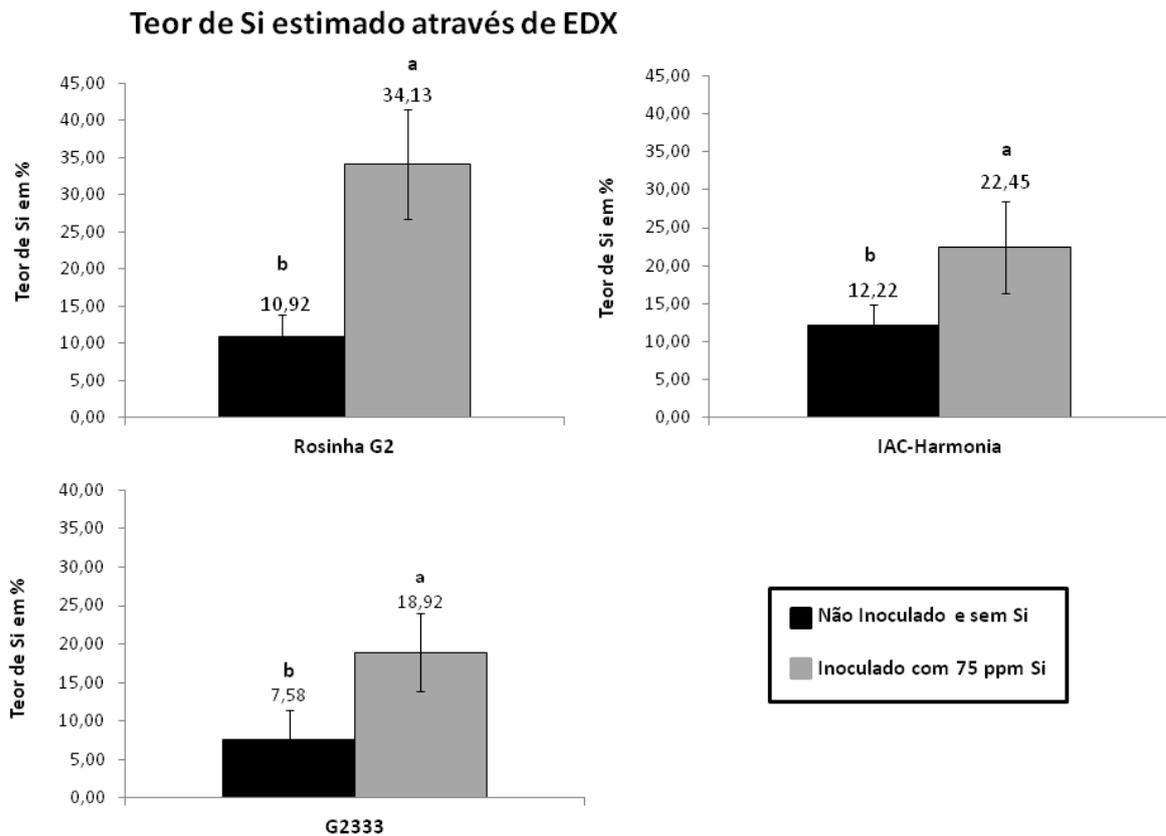


Figura 15 - Análise do teor de Si, por *EDX*, em folhas de feijoeiro sob tratamento com 75 ppm de silicato de potássio. As letras diferentes indicam diferença significativa a $p < 0,05$

Segundo Moraes et al., (2006) em feijoeiros tratados com silicato de sódio (1,26 g de SiO_2 por litro de água) e de cálcio (1,89 de SiO_2 por g de solo) via solo e via foliar respectivamente, verificou-se também uma maior quantidade de silício em folhas de plantas suplementadas com o elemento, indicando sua absorção e translocação no feijoeiro. Destacaram-se com maior pico de Si as plantas pulverizadas com o silicato de sódio e este resultado, segundo os autores se deve ao fato de que o silicato de sódio apresenta uma maior solubilidade, o que favoreceu a sua absorção.

Análises de *EDX* em arroz revelaram que plantas não tratada com o mineral apresentam um pequeno nível de Si nas cultivares Jinmi e Hwaseong (suscetível e resistente à brusone, respectivamente). Maiores níveis de Si (de cinco a oito vezes) foram encontradas em ambas cultivares tratadas com o mineral em relação às não tratadas. Assim como neste estudo, maiores teores de Si foram encontradas na cultivar suscetível (KIM et al., 2002).

Em soja, as análises de EDX revelaram que o conteúdo de Si não diferiu significativamente entre as plantas tratadas com 0,4 mM de silicato de potássio e as controle. Segundo os autores, existe uma ligação direta entre a habilidade da planta de absorver Si e os benefícios derivados desta interação. Isto explicaria o motivo pelo qual não houve remediação da soja infectada por ferrugem promovida pela adição dessa concentração de silicato de potássio (ARSENAULT-LABRECQUE et al., 2012).

3.4 CONCLUSÕES

- O feijoeiro mostrou-se responsivo à adição de Si no substrato, como evidenciado pela análise de teor deste elemento em folhas, em todas as variedades aqui estudadas;
- Não foram encontradas diferenças significativas para o número de tricomas unciformes e glandulares entre as três variedades de feijoeiro estudadas; entretanto, o número de estômatos foi significativamente maior na variedade IAC-Harmonia;
- Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi observado que os três genótipos, quando suplementados com Si, apresentaram formação de cera epicuticular;
- Os genótipos IAC-Harmonia e Pérola apresentaram uma redução dos sintomas da antracnose quando as plantas foram suplementadas com Si;
- Através da análise por EDX foi possível notar que o teor de Si nas folhas de feijoeiro aumentou com o suplemento de Si.

REFERÊNCIAS

- ARSENAULT-LABRECQUE, G.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Effect of silicon absorption on Soybean resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in different cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 1, p. 37-42, 2012.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, Lancaster, v.87, p.1184-1191, 1997.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. **Planta**, Berlin, v. 202, p. 1-8, 1997.
- BRAGA, F.T.; NUNES, C.F.; FAVERO, A.C.; PASQUAL, M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 128-132, 2009.
- CAI, K.; GAO, D.; LUO, S.; ZENG, R.; YANG, J.; ZHU, X. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 134, p. 324-333, 2008.
- CHAIN, F.; CÔTÉ-BEAULIEU, C.; BELZILE, F.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, RR. A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 22, n. 11, p. 1323-1330, 2009.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Research constraints provisionally identified by CIAT. In: Workshop on advanced *phaseolus* bean research network, 1990, Cali, p.30 , 1990.
- DAHLIN, R.M.; BRICK, M.A.; OGG, J.B. Characterization and density of trichomes on three common bean cultivars. **Economic Botany**, New York, v. 46, n. 3, p. 299-304, 1992.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 50, p. 641-664, 1999.
- FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.
- FIGUEIREDO, M. B. Aplicação do método Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13. 1967.
- GHAREEB, H.; BOZSÓ, Z.; OTT, P.G.; REPENNING, C.; STAHL, F.; WYDRA, K. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates the priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, p. 83-89, 2011.

GOUSSAIN, M.M.; MORAES, J.C.; CARVALHO, J.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L. Efeito e aplicação de silício em plantas de milho no desenvolvimento biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 305-310, 2002.

GUÉVEL, M.H.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 429-436, 2007.

ISHIKAWA, F.H.; BARCELOS, Q.L.; ALVES, E.; CAMARGO Jr, O.A.; de SOUZA, E.A. Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 4, p. 270-277, 2010.

JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARLTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, p. 337-3353, 1957.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-238, 1965.

KIM, S.G.; KIM, K.W.; PARK, E.W.; CHOI, D. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, n. 10, 2002.

KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; NOLLA, A. análise do silício: Solo, planta e fertilizante. Universidade Federal de Uberlândia, **Boletim Técnico**, Uberlândia, 2004.

MA, J.F.; TAMAI, K.T.; ICHII, M.; WU, G.F. A rice mutant defective in Si uptake. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 2111-2117, 2002.

MA, J.F.; YAMAJI, N.; TAMAI, K.; MITAMI, N. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 919–924, 2007.

MORAES, S.R.G.; POZZA, E.A.; ALVES, E.; POZZA, A.A.A.; CARVALHO, J.G.; LIMA, P.H.; BOTELHO, A.O. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2006.

OLIVEIRA, L.A. **Silício em plantas de arroz e feijão: absorção, transporte redistribuição e tolerância ao cádmio**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ORIANI, M.A.G.; VENDRAMIM, J.D.; BRUNHEROTTO, R. Influencia dos tricomas na preferência para oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em genótipos de feijoeiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 97-103, 2005.

PARK, S.J.; TIMMINS, P.R.; QUIRING, D.T.; JUI, P.Y. Inheritance of leaf area and hooked trichome density of the first trifoliate leaf in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 74, p. 235-240, 1994.

PARON, M.J.F.O.; LARA, F.M. relação Relação entre tricomas foliares de genótipos de feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* L. e a resistência a *Diabrotica speciosa* Germer, 1824 (*Coleoptera Chrysomelidae*). **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 29, n.4, p. 894-898, 2005.

POZZA, A.A.A.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; de CARVALHO, J.G.; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P.T.G.; SANTOS, D.M. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, 2004.

RICHMOND, K.; SUSSMAN, R. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 6, p. 268–272, 2003.

RODRIGUES, F.A.; de OLIVEIRA, L.A.; KORNDÖRFER, A.P.; KORNDÖRFER, G.H. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 134, p. 14-20, 2011.

SEEBOLD, K.W.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, F.J.; KUCHAREK, T.A.; SNYDER, G.H. Effect of silicon rate and host resistance on blast, scald and yield of upland rice. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n, 8, p. 871-876, 2000.

SEEBOLD, K.W.; KUCHAREK, T.A.; DATNOFF, L.E.; CORREA-VICTORIA, F.J.; MARCHETTI, M.A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars in rice. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2001.

STENGLLEIN, S.A.; ARAMBARRI, A.M.; VIZGARRA, O.N.; BALATTI, P.A. Micromorphological variability of leaf epidermis in Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Leguminosae*). **Australian Journal of Botany**, East Melbourne v. 52, p. 73-80, 2004.

STENGLLEIN, S.A.; ARAMBARRI, A.M.; SEVILLANO, M.C.M.; BALATTI, P.A. Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (*Leguminosae-Phaseolae*). **Flora**, Jena, p. 285-295, 2005.

TEIXEIRA, I.R.; da SILVA, R.P.; da SILVA, A.G.; KORNDÖRFER, P.H. Fontes de silício em cultivares de feijão nas safras das águas e da seca. **Revista Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v. 39, n. 4, p. 562-568, 2008.

4 DETERMINAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ATRAVÉS DE BIBLIOTECA SSH

RESUMO

Este estudo visou analisar quais os genes mais expressos em feijoeiro quando a planta enfrenta um ataque do patógeno da antracnose, *Colletotrichum Lindemuthianum*, e a contribuição do Si na expressão de genes relacionados à infecção. Duas bibliotecas subtrativas foram construídas visando estudar os genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas e não-inoculadas (A) e entre plantas inoculadas e tratadas ou não com 75 ppm de Si (B). As bibliotecas foram sequenciadas e anotadas, construindo um banco de dados, futuramente disponível publicamente. Foram geradas 1703 sequências para as duas bibliotecas, agrupadas em 991 sequências únicas por similaridade pelo pacote de softwares *Phred-Phrap* consed, e anotadas através de ferramentas de comparação BLAST, e categorizadas segundo suas funções biológicas e processos moleculares em que atuam via *GeneOntolgy*. Quinze genes de cada biblioteca foram selecionados para os experimentos de validação, onde os próprios mRNAs usados para a construção das bibliotecas foram analisados através de RT-qPCR, esperando encontrar uma maior expressão nas amostras tratadas em relação aos controles. Para a Biblioteca A, a análise por RT-qPCR mostrou que pelo menos 11 dos 15 genes avaliados se mostraram também positivamente regulados, e na Biblioteca B, 14 dos 15 genes mostraram algum tipo de indução, mostrando a eficiência da técnica de bibliotecas subtrativas em gerar transcritos diferencialmente expressos em uma dada condição de estudo.

Palavras chave: Feijoeiro. Antracnose. *C. lindemuthianum*. Silício. Biblioteca SSH; Expressão Gênica. RT-qPCR.

DETERMINATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES THROUGH A SSH LIBRARY

ABSTRACT

This study aimed to analyze which genes are expressed in common bean when plants are infected with the pathogen of anthracnose, *Colletotrichum lindemuthianum*, and the effect of silicon on the expression of genes related to infection. Two subtractive libraries were constructed to study differentially expressed genes between plants inoculated and non-inoculated (A) and between inoculated and treated or not with 75 ppm of Si (B). The libraries were sequenced and annotated, building a database, which will be published. In total, 1703 sequences were generated for the two libraries, those grouped in 991 unique sequences by similarity using the software package Phred-Phrap Consed, annotated by BLAST comparison tools, and categorized according to their biological functions and molecular processes via GeneOntolgy. Fifteen genes from each library were selected for validation experiments, where the mRNAs used to build the libraries were analyzed by RT-qPCR, expecting to find higher expression levels in treated samples compared to the controls. For library A, analysis by RT-qPCR showed that at least 11 of the 15 genes evaluated were positively regulated, and for Library B, 14 of the 15 genes showed some type of induction, demonstrating the efficiency of the subtractive library technique in generating transcripts differentially expressed in a given condition.

Key words: Common bean. Anthracnose. *C. lindemuthianum*. Silicon. Suppressive subtractive hybridization (SSH). Gene expression. RT-qPCR.

4.1 INTRODUÇÃO

A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo. Dentre as defesas utilizadas pelas plantas está a resposta hipersensitiva (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (FERNANDES et al., 2009).

Já foram descritos diversos benefícios do uso do silício em plantas como, por exemplo, melhorias nas propriedades mecânicas (estatura, penetração das raízes no solo, exposição das folhas à luz, devido a melhorias estruturais na planta), redução na transpiração, tolerância à seca e salinidade e a metais tóxicos e principalmente na composição química e enzimática da planta, alterando a resistência ou tolerância a patógenos, ativando a produção de enzimas relacionadas com mecanismos de defesa (FAUTEUX, 2005; RODRIGUES et al., 2011). O efeito de melhoria da resistência à doença através do silício já foi amplamente avaliada em diferentes culturas (SEEBOLD et al., 2000 e 2001; GOUSSAIN et al., 2002; GUÉVEL et al., 2007; CHAIN et al., 2009; GHAREEB et al., 2011).

Desta forma, a identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra patógenos. A Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH), é uma metodologia que se baseia na amplificação preferencial de sequências diferencialmente representadas em duas populações de cDNA, enquanto que o fenômeno da supressão impede a amplificação das sequências comuns (DIATCHENKO et al., 1996). Esta metodologia já foi amplamente usada para a seleção de genes diferencialmente expressos em diferentes espécies (GUZZO, 2004; MILES; DAY; SCHILDER, 2011; RECCHIA, 2011; SINGH et al., 2012).

No presente estudo duas bibliotecas SSH foram construídas, a primeira visando estudar quais são os genes expressos diferencialmente entre plantas inoculadas e não-inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum* (A) e a segunda foi construída através de plantas inoculadas com a raça 65 do patógeno, em substratos acrescidos ou não de Si (75 ppm), visando elucidar quais são os genes que apresentam expressão diferencial nestas condições (B).

Com posse das sequências das duas bibliotecas, ambas foram submetidas a análises de bioinformática e em seguida, foram categorizadas com base no *GeneOntology*.

Depois da categorização foi realizado um experimento de validação das bibliotecas, que tem por objetivo, verificar a eficiência da SSH em selecionar transcritos diferencialmente expressos em relação aos seus controles. Para isso, *primers* para 15 transcritos de cada uma das bibliotecas foram selecionados e submetidos a experimentos de RT-qPCR.

A técnica de RT-qPCR foi selecionada para este fim por ser é uma técnica extremamente sensível e de baixo custo para a quantificação de transcritos (PFAFFL et al., 2002; UDVARDI et al., 2008; SCHEFE et al., 2006).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

No estudo apresentado no capítulo anterior foi mostrado que a absorção do Si começa a ser tornar mais evidenciada a partir de 14 dias após o transplante. Com base neste resultado, usamos este período para os estudos de remediação e a coleta de amostras para construção de bibliotecas SSH, utilizando a cultivar tolerante IAC-Harmonia. Desse modo, dois tratamentos contrastantes foram aplicados em cada ensaio. No primeiro, plantas inoculadas e não-inoculadas com *C. lindemuthianum* (raça 65) foram coletadas para a construção de uma biblioteca substrativa, denominada **Biblioteca A**. Em outro ensaio em condições semelhantes, plantas tratadas ou não com silicato de potássio (75 ppm) foram inoculadas, e usadas para a elaboração de biblioteca substrativa, denominada **Biblioteca B**.

4.2.2 Bibliotecas

Biblioteca A

O objetivo da Biblioteca A foi identificar e selecionar genes diferencialmente expressos na interação entre *C.lindemuthianum* x feijoeiro. O genótipo IAC-Harmonia foi selecionado

por ser tolerante à antracnose, um intermediário entre variedades susceptíveis e resistentes, e como visto no Estudo 1, mostrou uma atenuação do ataque do patógeno – resultando em um menor grau de infecção - quando suplemento de Si foi adicionado. A construção desta biblioteca foi realizada a partir de duas amostras: a primeira, constituída de um *bulk* de plântulas inoculadas com o patógeno da raça 65; e a segunda, um *bulk* de plântulas não-inoculadas. A biblioteca subtrativa foi construída com o intuito de subtrair transcritos da segunda amostra na primeira amostra, tentando evidenciar genes que estariam respondendo apenas ao ataque do patógeno. As plântulas cresceram em condições de casa vegetação e, quando inoculadas, foram incubadas em câmara de nebulização no Centro de Grãos e Fibras do IAC-Campinas.

Biblioteca B

A Biblioteca B foi construída contrastando plântulas do genótipo IAC-Harmonia que foram irrigadas com solução nutritiva contendo 75 ppm silicato de potássio e plântulas em que não foi adicionada esta fonte de silício. No entanto, todas as plantas foram inoculadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum*. Desse modo, a construção desta biblioteca visou detectar que genes foram diferencialmente expressos devido à adição de silício em plantas sob o ataque do patógeno.

Nos dois experimentos, foram realizadas coletas da parte aérea (caule e folha) de duas plantas de cada um dos dois vasos de cada tratamento (com e sem inoculação ou na presença ou ausência de silício) 72 horas após a inoculação. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido maceradas e por fim, mantidas em freezer -80°C. As terceiras plantas remanescentes em cada vaso serviram de controle experimental (testemunhas), para a avaliação dos sintomas da antracnose, sete dias após a inoculação.

4.2.3 Extração e Purificação de RNA total

As etapas a seguir foram realizadas para as duas bibliotecas. A extração de RNA total dos *bulks* contendo quatro partes aéreas de cada tratamento foi realizada com o uso do reagente *Trizol* (*Trizol®LS Reagent - Invitrogen*), seguindo recomendações do fabricante. Para facilitar o entendimento da construção da biblioteca subtrativa, as quantificações e géis

necessários para a confirmação de cada passo também será apresentado no Material e Métodos. Na Tabela 4, estão apresentadas as quantificações dos RNAs de cada um dos tratamentos obtidas através do equipamento Nanodrop® ND 1000.

Tabela 4 - Extrações de RNA de plantas de feijoeiro

Biblioteca	Amostra	Rendimento médio - ng/ μ L	260/280
A	Inoculada	886,0	2,02
	Não-inoculada	1003,1	2,00
B	Inoculada com Si	1617,2	1,99
	Inoculada sem Si	897,7	1,98

A qualidade da extração também foi observada em gel de agarose 1% (Figura 16). Na figura, podemos observar as bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18S e 28S bem claras e definidas.

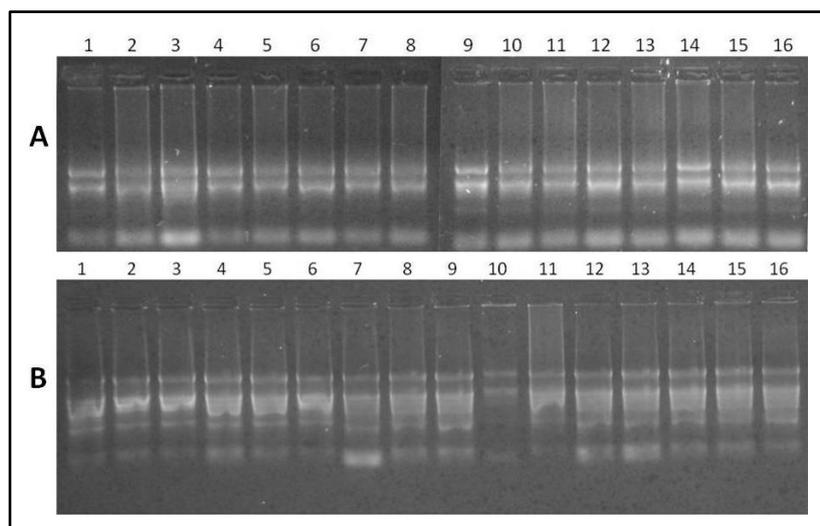


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1% das extrações de RNAs de plantas de feijoeiro. Biblioteca A, amostras de plantas inoculadas (1-8) e de plantas não inoculadas (9-16) e Biblioteca B, amostras inoculadas com supelmento de 75 ppm de Si (1-8) e inoculadas (9-16)

4.2.4 Purificação do mRNA

Diferentes extrações de cada tratamento (A e B) foram necessárias para obter a concentração inicial de 75 μ g de RNA total para o início da purificação. Os RNAs de cada tratamento foram então misturados, formando um *bulk* por tratamento, e o volume necessário

para obter a massa necessária de RNA total foi calculado. Em seguida, as amostras foram purificadas para a obtenção de mRNA utilizando *Invitrogen Dynabeads® mRNA Purification Kit*, seguindo as recomendações do fabricante.

O rendimento das purificações foi determinado através do Nanodrop® ND 1000. Para a Biblioteca A, o rendimento médio foi de 39,80 ng/μL, com pureza (A_{260}/A_{280}) de 1,95 para a amostra inoculada; e 42,56 ng/μL, com pureza de 2,02, para a amostra não-inoculada. Para a Biblioteca B, o rendimento foi de 30,15 ng/μL, com pureza de 1,96, para a amostra suplementada com Si, e de 28,85 ng/μL, com pureza de 1,96, para a amostra sem Si.

A massa de RNA purificada para as duas condições foram suficientes para a continuação da construção da biblioteca. Para dar início à síntese de cDNA, era necessário obter 1 μg de mRNA em volume de 3,5 μL. Por isso, as amostras foram concentradas no equipamento *Eppendorf Vacufuge Concentrator*, e depois ressuspensas em 3,5 μL.

4.2.5 Construção da biblioteca subtrativa de cDNA

A partir dos mRNAs obtidos das plantas dos dois experimentos (para as Bibliotecas A e B), as fitas de cDNA foram sintetizadas utilizando-se *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit* (*Clontech Laboratories, Inc.*), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.6 Síntese da 1ª fita de cDNA e amplificação por LD-PCR.

As amostras foram combinadas com 1 μL de 3' *SMART CDS Primer II* e incubadas por 3 minutos a 72°C, seguidos de 2 minutos a 42°C. Logo em seguida, foram misturadas a um mix contendo 2 μL de *5X First-Strand Buffer*, 0,25 μL de DDT (100 mM), 1 μL de dNTP Mix (10 mM), 1 μL de *SMARTer II Oligonucleotide* (12 μM), 0,25 μL de *Rnase Inhibitor* e 1 μL de *SMATscribe™ Reverse Transcriptase (100 U)* e incubadas em PCR por 1 hora a 42°C e 10 minutos a 70°C.

Após a geração de cDNA fita simples, estas foram amplificadas por LD-PCR (*Long-Distance PCR*), utilizando *Advantage® 2 PCR Kit* (*Clontech Laboratories, Inc.*), segundo manual do fabricante. A reação de 300 μL foi dividida em 6 tubos nomeados de A1, A2, B1, B2, C1 e C2, ambos contendo 50 μL. Os tubos foram submetidos a PCR (95°C por 1 minuto; 15 ciclos de 95°C por 15 segundos; 65°C por 30 segundos e 68°C por 3 minutos), para a

determinação do número de ciclos necessários para a obtenção do fragmento ideal. No início, todos os tubos foram submetidos a 15 ciclos de PCR. Depois disso, 30 μL da reação do tubo C2 foi transferida para um segundo tubo denominado de otimização. Os outros tubos (A1, A2, B1, B2 e C1 e o restante do volume do tubo C2) foram mantidos a 4° C. Dos 30 μL usados para esta otimização, 5 μL da amostra referente ao ciclo 15 da PCR foram transferidos para um tubo novo. O mesmo procedimento foi repetido para os ciclos 18, 21, 24 e 27, e os produtos submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % contendo além do *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) (0,1 μg), as amostras de 5 μL referentes aos ciclos de otimização. Com base no gel, selecionamos a melhor qualidade do produto de amplificação.

Os resultados de quantidade e qualidade das amostras foram então analisados através de 5 μL das amostras, retiradas ao final de cada ciclo de amplificação em um gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA (Figura 17).

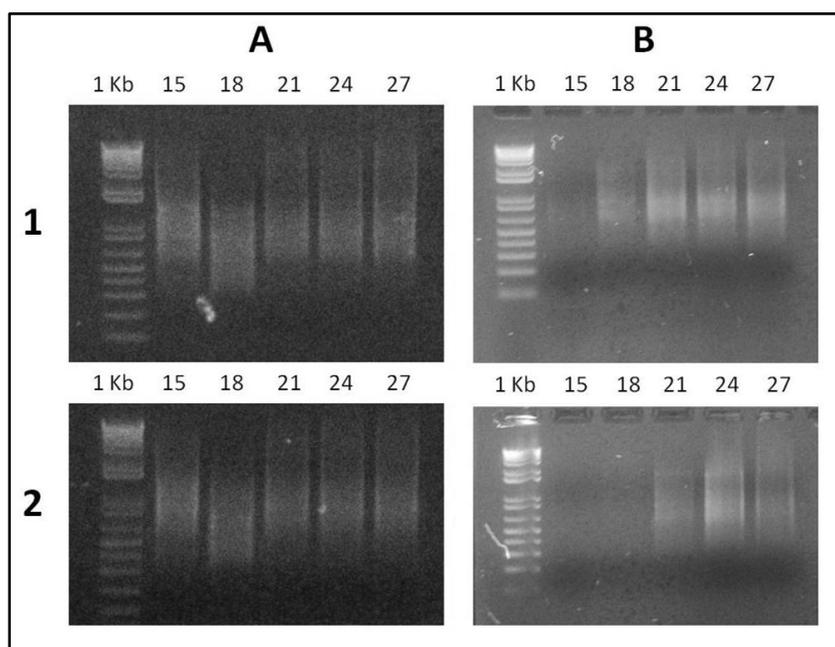


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% para a verificação da qualidade dos produtos de ds cDNA das amostras da Biblioteca A e B após os testes de otimização do número de ciclos de amplificação. Em A1 podemos observar o padrão de amplificação da amostra inoculada, e em A2, da amostra não inoculada. Em B1 podemos observar o padrão de amplificação da amostra inoculada + Si, e em B2, da amostra inoculada sem Si. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

Para a Biblioteca A, um rastro intenso, com amplitude variando entre 500 a 1500 pares de bases foi obtido após os 15 ciclos de amplificação (A1 e A2). Já para a Biblioteca B, os ciclos ideais para a amostra com Si foram de 20 (B1) e para a amostra sem Si, foi de 23 ciclos (B2). Os ciclos subsequentes mostram uma diminuição na intensidade do rastro de amplificação, indicando que os números dos produtos de PCR pararam de aumentar, atingindo assim um platô.

4.2.7 Cromatografia em coluna

Após a obtenção das fitas duplas de cDNA (ds-cDNA), estas foram purificadas para a obtenção de fragmentos de tamanho adequado para a construção das bibliotecas (A e B) utilizando para isso, o kit de purificação *CHROMA SPIN-1000* de acordo com as instruções do manual do *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories, Inc.)*.

Antes de proceder com o processo de purificação das amostras de ds cDNA através do *Kit CHROMA SPIN-1000*, foram reservados 7 µL de cada uma das amostras de cada uma das bibliotecas A e B para análise comparativa em gel de agarose. Após o processo de purificação das fitas de ds cDNA obtidas, a concentração dos produtos purificados foram visualizados em gel de agarose 1,2% em 1X TAE buffer, junto com padrão de 1kb de DNA (Figura 18).

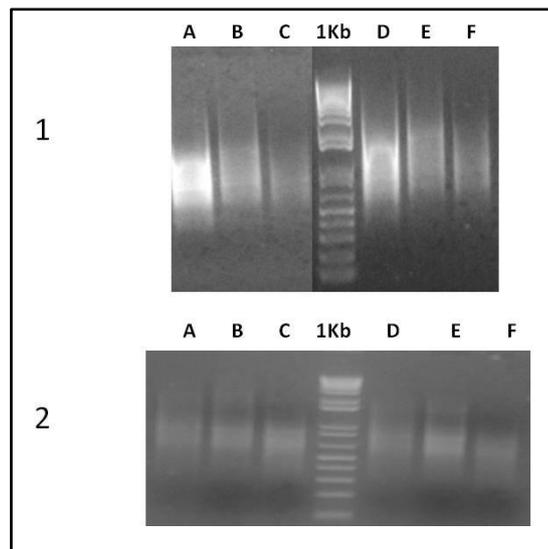


Figura 18 - Gel de agarose 1,2% contendo amostras após cromatografia da Biblioteca A onde: A1, B1 e C1 são referentes ao tratamento inoculado; D1, E1 e F1, ao tratamento não inoculado; e da Biblioteca B, onde A2, B2 e C2 correspondem ao tratamento suplementado com Si, e as amostras D2, E2 e F2 correspondem ao tratamento sem Si. Em A temos o produto de PCR não purificado; B. produto de PCR purificado (320µL de 1x TNE); C. produto de PCR purificado (75 µL de 1x TNE). Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

4.2.8 Digestão das fitas de ds-cDNA

Após a purificação as amostras foram então digeridas com enzima de restrição *RsaI* para receberem os adaptadores necessários para o processo de construção de bibliotecas subtrativas. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com as instruções contidas no

manual do fabricante. Para confirmar o sucesso da digestão, 10 μ L de cDNA não digerido e 10 μ L de cDNA digerido com *RsaI*, foram dispostos em gel de agarose 1,2%.

Segundo o manual, na amostra não digerida deveria aparecer um rastro de maior intensidade com tamanho variando entre 0,5 e 10 kb, por outro lado, para a amostra digerida um rastro de menor intensidade e de tamanho estimado entre 0,1 e 2 kb. Conforme podemos observar na Figura 19, para as duas amostras os resultados obtidos foram os mesmos previstos no manual do fabricante.

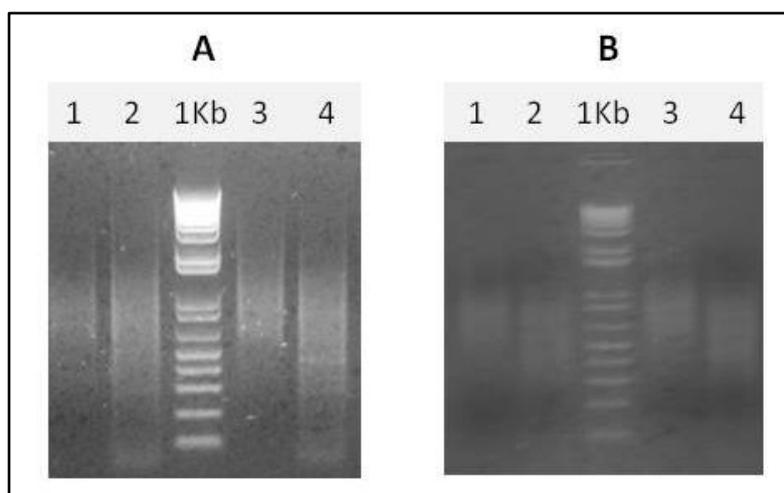


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com as amostras das bibliotecas A e B após digestão com *RsaI*. Em A1 temos a amostra inoculada e digerida e em A2 a amostra inoculada e não digerida. Em A3 temos a amostra não inoculada e digerida e em A4 a amostra não inoculada e não digerida. Em B1 temos a amostra inoculada na presença de Si e digerida e em B2 a amostra inoculada na presença de Si e não digerida e por fim, em B3 temos a amostra inoculada na ausência de Si e digerida e em B4 a amostra inoculada na ausência de Si e não digerida. Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

4.2.9 Purificação da digestão e ligação dos Adaptadores

Após as amostras de ds-cDNA terem sido digeridas com *RsaI*, todos os procedimentos posteriores, desde a purificação até as hibridizações e amplificação dos produtos de subtração foram conduzidos de acordo com as especificações fornecidas no manual do *PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Inc.)*.

4.2.10 Ligação dos adaptadores

A partir deste ponto, as amostras foram separadas em ‘tester’ (amostra inoculada em A, e com Si em B) e ‘driver’ (não inoculada em A, e sem Si em B). As próximas etapas

(ligação de adaptadores 1 e 2R) foram conduzidas somente na amostra tester, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram divididas em duas alíquotas e cada uma submetida a uma reação de ligação com um dos adaptadores. Diluiu-se 1 μL de cada cDNA experimental digerido em 5 μL de água estéril. O mix da reação de ligação foi feito com 3 μL de água, 2 μL de *5X Ligation Buffer* e 1 μL de *T4 DNA Ligase*. Para cada *tester* de cDNA, os reagentes foram combinados segundo a Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes usados na ligação dos adaptadores

Reagentes	Tester 1-1	Tester 1-2
cDNA diluído	2 μL	2 μL
Adaptador 1	2 μL	-
Adaptador 2R	-	2 μL
Master Mix	6 μL	6 μL
Volume Final	10 μL	10 μL

Em um novo tubo, coletou-se 2 μL do *tester 1-1* e 2 μL do *tester 1-2* que foi usado como o controle não subtraído 1c. As amostras foram então incubadas a 16^o C por 16 horas, seguidas de adição de 1 μL de *EDTA/Glycogen Mix* para parar a reação. As amostras foram então submetidas a 72^o C por 5 minutos em termociclador para inativar a ligase. Removeu-se 1 μL do controle *tester* não subtraído, que foi diluído em 1 mL de água.

4.2.11 Análise da ligação

Esse procedimento foi realizado para verificar se pelo menos 25% dos cDNAs possuem adaptadores nas duas extremidades. Para isso, usou-se o *primer* MAPKINASE (*Fw*: CGAGAGGATCAACACGGCATA; e *Rv*: CCTGCCCATGTAGAACTCCAA). Diluiu-se 1 μL de cada amostra dos cDNAs ligados (*tester 1-1* e *1-2*) em 200 μL de água, e em seguida foram adicionados os seguintes reagentes, em quatro tubos (Tabela 6).

Tabela 6 - Reagentes usados na análise da ligação

Componentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Tester 1-1 (ligado ao adaptador 1)	1 µL	1 µL	-	-
Tester 1-2 (ligado ao adaptador 2R)	-	-	1 µL	1 µL
MAPKINASE 3´	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
MAPKINASE 5´	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
PCR <i>Primer</i> 1	1 µL	-	1 µL	-
Volume total	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL

Em cada um dos quatro tubos, foram adicionados os reagentes: 18, 5 µL de água; 2,5 µL de *10X PCR reaction Buffer*; 0,5 µL *dNTP Mix* e 0,5 µL de *50X Advantage cDNA Polymerase Mix*, totalizando um volume final de 22 µL. Incubou-se as reações a 75°C por 5 minutos no termociclador para a extensão dos adaptadores e logo em seguida, iniciou-se o seguinte ciclo de amplificação: 94°C por 30 segundos e 30 ciclos de 94°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos e 68°C por 2,5 minutos. Aliquotas de 5 µL de cada reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% com TAE 1X para avaliar a eficiência da ligação.

4.2.12 Hibridizações

Nesta etapa, um excesso de cDNA da amostra ‘*driver*’ (IAC-Harmonia Não-inoculado para A e IAC-Harmonia Inoculado na ausência de Si para B) 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) foram enriquecidas pelas sequências diferencialmente expressas já que cDNAs não alvo presentes nas amostras de ‘*tester*’ e ‘*driver*’ formaram híbridos.

1ª Hibridização: as reações foram montadas e conduzidas seguindo instruções presentes no manual do fabricante. Nesta etapa todas as amostras *tester* foram hibridizadas às amostras *drivers* utilizando-se 1 µL de *4x Hybridization Buffer*.

2ª Hibridização: as amostras provenientes da 1ª hibridização foram misturadas (cada biblioteca separadamente) e o cDNA da amostra *driver* desnaturado foi novamente adicionado para um enriquecimento adicional das sequências diferencialmente expressas. Ao final do procedimento novas moléculas híbridas foram obtidas, consistindo em fitas duplas de cDNAs diferencialmente expressos com ambos os adaptadores nas extremidades.

4.2.13 Amplificação das sequências 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 sequências de diferentes adaptadores em cada extremidade e outra, utilizando *Nested PCR Primer 1* e *Nested PCR Primer 2R*, para enriquecimento das sequências diferencialmente expressas. A qualidade dos produtos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% em 1X TAE *buffer*, junto com o padrão *1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)*.

4.2.14 Purificação do DNA

Para este procedimento, 7 µL dos produtos de PCR subtraídos nas duas bibliotecas de cDNA após a 2ª hibridização e amplificação com *primers nested*, foram aplicados em um gel de agarose 1% em *1x TSB buffer*, junto com padrão de 1kb de DNA. Os fragmentos do gel foram separados em fragmentos menores que 1,5kb e fragmentos maiores que 1,5kb, cortados com auxílio de bisturi e purificados a partir do gel utilizando o kit de purificação *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences)*.

4.2.15 Clonagem em vetor usando pGEM®- T Easy Vector

A reação adotada para a ligação dos produtos de PCR das bibliotecas, já purificados, ao vetor *pGEM®- T Easy* foi a seguinte: 5 µL de *2x Rapid Ligation Buffer*, 1 µL de *pGEM®-*

T Easy Vector (50 ng), 3 μ L de Produto de PCR, 1 μ L de *T4 DNA Ligase* (3 unidades Weiss/ μ L) e água deionizada para completar o volume final (10 μ L). A reação foi incubada por 16h a 4°C.

4.2.16 Transformação em bactérias quimiocompetentes

Em tubos de 1,5 mL, 10 μ L da ligação foram adicionadas e 70 μ L de *Transformation buffer* e, em seguida, essa mistura foi adicionada à 100 μ L de células competentes de *Escherichia coli* de cepa *DH5 α* que foram mantidas no gelo por 30 min. Em seguida, foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Depois disso, adicionou-se 1mL de meio LB, seguido de incubação a 37°C por 50 min. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 μ g/mL de ampicilina, X-Gal e IPTG. As placas foram incubadas por 16h em estufa a 37°C.

4.2.17 Preparação de DNA plasmidial em placas

As colônias de bactérias transformadas foram coletadas com o auxílio de um palito de dente autoclavado, e distribuídas em cinco placas contendo os fragmentos curtos e em cinco placas contendo os fragmentos longos para cada uma das bibliotecas. As bactérias foram transferidas para placas de 96 poços contendo 1 mL de meio *Circle Grow* (GC) com 50 μ g/mL de ampicilina por poço, e as placas foram incubadas a 37°C em agitador por 18-20 h de incubação. Depois disso, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 6 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e ao *pellet* foram adicionados 240 μ L de *GTE buffer*. A placa foi selada com adesivo e logo em seguida, agitadas para ressuspender os *pellets*. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 6 minutos. Descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados mais 80 μ L de *GTE* e as placas foram seladas e agitadas novamente. Enquanto isto, em placas de fundo V foram dispensados 2,5 μ L de RNase (10 μ g/ μ L). Transferiu-se 60 μ L do homogeneizado para as placas contendo RNase, seguido da adição de 60 μ L de NaOH/SDS. As placas foram novamente seladas e misturadas por inversão durante 30 segundos. Adicionou-se 60 μ L de KOAc 3M (4°C), selou-se as placas e elas foram homogeneizadas 30 segundos. As placas foram então incubadas 90°C por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C. Destas placas foram retirados 130 μ L de cada poço. As placas foram seladas, agitadas e centrifugadas a

4000 RPM, durante 45 minutos a 4° C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol 70% gelado, seguida de nova centrifugação a 4000 RPM, por 5 minutos. As placas ficaram a temperatura ambiente até secar e em seguida, adicionou-se 80 µL de água Milli-Q para ressuspender. A qualidade de algumas amostras dos DNAs foram analisadas em gel de agarose 1%.

4.2.18 Protocolo de sequenciamento

O sequenciamento de 10 placas de cada uma das bibliotecas foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - UNICAMP. 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* M13F (GTAAAACGACGGCCAGT); 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 minutos, seguidos de 25 ciclos de 96°C por 12 segundos; 50°C por 6 s e 60°C por 4 minutos. A precipitação foi feita pela adição de 80 µL de etanol 80%. Logo após, as placas foram seladas e invertidas manualmente por 30 segundos e deixadas de repouso por 15 minutos. Após esse período, centrifugaram-se as placas por 45 minutos a 4000 RPM. Descartou-se o sobrenadante e mais 150 µL de etanol 70% foram adicionados. Logo em seguida, outra centrifugação foi feita com os mesmos parâmetros por apenas 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as placas foram deixadas a temperatura ambiente até secar. Antes de ir para o sequenciador, as placas foram ressuspensas em 10 µL de formamida e deixadas em repouso por 10 minutos. Em seguida, as placas foram desnaturadas na PCR (96°C por 10 minutos). O sequenciamento foi feito no sequenciador *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems)*, através do sistema *BigDye v 3.1*.

4.2.19 Análise das sequências (Bioinformática)

Um *site* foi criado no Servidor *PowerEdge 2900* da *Dell* para montagem do banco de dados e análises de bioinformática deste projeto (<http://bmp.cbmeg.unicamp.br/TS/>). Os dados de sequenciamento foram gerados no sequenciador e enviados ao servidor. Um programa detecta a recepção de arquivos contendo cromatogramas e faz o tratamento inicial

de limpeza das sequências através do *Phred* e *Phrap*, que identifica e atribui qualidade às bases. O *Phred* (www.phrap.com) converte os *ESTs* em sequências de nucleotídeos atribuindo um valor de qualidade para cada base. Além disso, utilizou-se o programa *Crossmatch* para a retirada das sequências de vetor. Após esta etapa fez-se um processo de triagem dos dados (TELLES; da SILVA, 2001), onde foram removidas todas as sequências poli-A/T e regiões de sequências de baixa qualidade.

Depois disso, as sequências foram comparadas a de outros organismos, disponíveis em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O software *BLAST* foi utilizado para esta comparação (ALTSCHUL, et al 1990). Os bancos são atualizados mensalmente de forma automática, sendo todos os resultados de *BLAST* atualizados também.

O programa usado para as montagens foi o *CAP3* (HUANG; MADAN, 1999). Esta etapa teve como objetivo eliminar as redundâncias e produzir sequências mais longas e de maior qualidade, através do agrupamento de *ESTs* com similaridade entre as sequências. O rendimento das bibliotecas foi considerado bom, uma vez que mais que 75% das sequências apresentam no mínimo 350 nucleotídeos com qualidade “*Phred Quality*” igual ou maior do que 20.

Como as sequências geradas pelas bibliotecas subtrativas foram digeridas antes da clonagem, é muito provável que diferentes clusters ou singlets representem, mesmo após a clusterização, um mesmo gene. Para tentar reduzir esta redundância, o banco foi novamente clusterizado usando, junto com as sequências do banco, sequências-molde de genes de soja do *GenBank*. A idéia é que os cDNAs de feijão de um dado gene A que sofreu o processo de restrição enzimática, gerando dois ou mais fragmentos – que portanto seriam impossibilitados de serem agrupados em um mesmo *cluster* – poderia ser montado em um mesmo *cluster* com a sequência completa do gene A de soja, uma vez que sequências nucleotídicas são muito conservadas entre estas duas espécies. Esta sequência-molde do gene A de soja, por ser completa, conseguiria juntar vários *clusters* formados por “pedaços” do gene A em feijão, aumentando assim o tamanho do *cluster* e reduzindo a redundância. Após a nova análise, as sequências-molde de soja foram retiradas da contagem de *reads* de cada *cluster*, e o resultado final indicou com maior precisão do que antes a frequência com que um gene apareceu na biblioteca.

4.2.20 Anotação das sequências através do *Gene Ontology*

Os programas *Blast2GO* (www.blast2go.org/) e *GOSlim Viewer* (http://agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer_select.pl) foram usados para categorizar as duas bibliotecas SSH geradas neste trabalho.

4.2.21 Desenho dos primers para validação das Bibliotecas

Genes possivelmente relacionados à resposta a estresse biótico (biblioteca A) ou responsáveis ao silício (biblioteca B) foram selecionados. Estes foram então submetidos a uma clusterização onde o número de contigs em cada biblioteca foi obtido. Com base nessa análise, genes exclusivos ou diferencialmente expressos na biblioteca A ou B foram identificados e com base na anotação feita pelo GO, as sequências possivelmente relacionadas ao estudo foram selecionadas para o desenho dos *primers*.

Para a validação da biblioteca SSH, as sequências específicas em cada uma das bibliotecas foram selecionadas da clusterização. Em seguida, os *primers* para o PCR em tempo real foram desenhados através do programa *Primer3* input (www.frodo.wi.mit.edu/) seguindo os seguintes parâmetros: tamanho do produto: de 150-200 pares de base; tamanho do *primer*: entre 18 e 22 sendo o tamanho de 20 o considerado ideal; a temperatura de melting entre 57 e 63°C sendo 60°C a ideal e a %GC: 40-60%. Para cada gene, foram selecionados os quatro melhores pares de *primers* gerados pelo programa e em seguida, os mesmos foram testados no programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html) que indicaria se haveria a possibilidade destes pares de *primers* formarem grampos, dímeros, cross-dímeros, palíndromos e ligações na região 3', fatores estes que levam a formação de produtos inespecíficos que inviabilizariam os mesmos nos ensaios de qPCR. A lista com os *primers* desenhados pode ser encontrada na Tabela 7 (biblioteca A) e Tabela 8 (biblioteca B).

Tabela 7 - Primers desenhados para validação da biblioteca SSH construída a partir da subtração de amostra inoculada com o patógeno pela amostra não inoculada

<i>Primer</i>	Frequência na Biblioteca A	Frequência na Biblioteca B	Contig	Descrição da sequência	Sequência – <i>primer Fw</i>	Sequência – <i>primer Rv</i>
1	4	0	Contig12589	<i>Glyma12g35070.1 Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs</i>	AAGGCTGTTTTGTGGGATTG	AACTTGATCTGCCGGGTATG
2	3	0	Contig12691	<i>Glyma15g06780.1 basic pathogenesis-related protein 1</i>	CTTCCTCAACGCTCACAACA	ACTGCTCCATGCAAGGTTCT
3	2	0	Contig10740	<i>Glyma09g21900.1 Terpeno sintase 02</i>	GGAGCAAACATGGAACCACT	TCAAAGCCATGTCGTCTGAG
4	2	0	Contig12567	<i>Glyma06g44640.1 O-acyltransferase (WSD1-like) family protein</i>	GCTTGGTCTTGATTGCTTTGA	GCTCCATGTCAGATTTTGGGA
5	2	0	Contig12593	<i>Glyma06g21790.1 Leucine-rich repeat (LRR) family protein</i>	GCAACAGATGGAAGGGTTTC	TCCCCATTGTAAATGGTCTCA
6	2	0	Contig12708	<i>Glyma01g21590.1 UDP-Glycosyltransferase superfamily protein</i>	TGGTTCAGAATGGATGCAAAA	TTTGAATGGCATCACACAT
7	1	0	Contig12662	<i>Glyma12g10780.2 Isocitrato liase</i>	TTCTGGCATGAGTGATGAGC	TCAACCCCATGTTCCTCTC
8	7	1	Contig4583	<i>Glyma04g01920.1 catalase 2</i>	GGTCGCTTGGTCTGAATAA	AAGCCTGTGCCTCTGTGAAT
9	1	0	Contig9255	<i>Glyma19g36620.1 Fenilalanina amônia liase 1</i>	CATACCCACTGATGCAAAAA	TTTCAACCTCCTTTGGCAAG
22	3	0	Contig2599	<i>Glyma13g28630.1 beta-amylase 3</i>	GCTGGGGAATTCCAGTGTTA	CCCAAGATGCTCCATCCTTA
24	8	1	Contig12573	<i>Glyma16g04940.1 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2</i>	TGCAGTTGGAAACAGTGGAG	TGAGGAGGTGAGAGGCTTGT
25	5	1	Contig2792	<i>Glyma17g04330.1 S-adenosylmethionine synthetase</i>	GGTCATGGTCTTCGGAGAAA	GCTCTGCTGCTCAATGTTCA

Continua...

<i>Primer</i>	Frequência na Biblioteca A	Frequência na Biblioteca B	Contig	Descrição da sequência	Sequência – <i>primer Fw</i>	Sequência – <i>primer Rv</i>
26	5	0	Contig9851	<i>Glyma05g03730.1 PGR5-LIKE A</i>	GAAGGAAGCAGCGTTGTCAT	ACCCTCAGCCACAATTCAC
27	5	0	Contig12577	<i>Glyma20g23420.1 glutathione S-transferase TAU 8</i>	TGGAAAAGGGCACAAGAAAC	GAGTCCAAGCATGCAACTGA
28	4	0	Contig12674	<i>Glyma01g02180.1 PLATZ transcription factor family protein</i>	CTGGCGTCCAAACCTACATT	TTCCAACAATCTTGCAACCA

Tabela 8 - *Primers* desenhados para validação da biblioteca SSH construída a partir da subtração de amostra inoculada com o patógeno com suplemento de Si pela amostra inoculada sem adição de Si

<i>Primer</i>	Frequência na	Frequência na	Contig	Descrição da sequência	Sequência – <i>primer Fw</i>	Sequência – <i>primer Rv</i>
14	0	1	Contig11544	<i>Glyma03g04960.1 lipid transfer protein 1</i>	AGATCAGCACCTCCACCAAC	CACCAAGAAAGACTCGCACA
15	0	1	Contig12863	<i>Glyma13g01250.1 CAP superfamily protein</i>	CCCAGTCAGTCCCAATCTA	TTGCTCTACCAAGTTGTGC
16	0	1	Contig9468	<i>Glyma07g04310.1 germin-like protein 1</i>	GCCATTGCTTTTGCTGTTTT	CTGCCCTAGCTTAGCCACTG
17	0	1	Contig9337	<i>Glyma04g01840.6 high mobility group B2</i>	ATGATGATGAGGAGGGCAGT	TTACGGAGGGAGCAGAGAAA
18	0	4	Contig12811	<i>Glyma06g12640.2 F-box/RNI-like superfamily protein</i>	GAAATGGTTGGCCAGGATAA	TGATCATCCACAAGGGACAA
19	0	3	Contig1065	<i>Glyma03g40280.3 copper/zinc superoxide dismutase 1</i>	CAGTTCCTGGCAGCAGTGAG	ACCATGCTCCTTGCCATTAG
29	1	3	Contig12829	<i>Glyma09g09940.1 gamma-soluble NSF attachment protein</i>	GCTCTCAATCGACCAACCAT	GCCAACTCGAAACCCATTAG
32	0	3	Contig12775	<i>Glyma02g15400.1 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily</i>	TCCATCACAGACCCTTCCTT	TCTTCTGCTCCTTCCTCTGG
34	0	3	Contig3486	<i>Glyma14g37440.1 glutamine-dependent asparagine synthase 1</i>	CTTGAGGGCTCACCAGATTT	GCGTGCTTGCTCTAATTGTG
35	0	2	Contig12845	<i>Glyma02g02740.1 DNAJ heat shock family protein</i>	CGGTTTTTGTTTCGTGTGTG	AGCGGGTCTTCAAGGTTTTT
36	0	2	Contig10506	<i>Glyma02g39630.1 NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	TGTGCCTAAGATGCAACGAG	TGCAGCAGCAATTATGGAAG
37	0	2	Contig12784	<i>Glyma03g32870.1 Oligosaccaryltransferase</i>	GGGAGAAGAAGGGAGAGAGC	TCCTCAAACCTGGGGTCAG

Continua...

<i>Primer</i>	Frequência na Biblioteca A	Frequência na Biblioteca B	Contig	Descrição da sequência	Sequência – <i>primer Fw</i>	Sequência – <i>primer Rv</i>
40	0	1	Contig4032	<i>Glyma02g16390.1 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1 (MCCA)</i>	GTTACGGTGGGTGAACAGGT	AATCAAATTCAAGGCGTTCCG
42	0	1	Contig12761	<i>Glyma07g04080.1 phospholipid:diacylglycerol acyltransferase</i>	GGCTCGTGGTAGTGCTCATT	ACACTCGGCAAAGGGAGTTA
44	0	3	Contig2103	<i>Glyma17g32100.1 Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein</i>	AGTGTGTGCATTGCTTTCG	TGGAAGCCAGAAGGAAGTGT

Após a verificação da qualidade dos pares de *primers*, uma reação de PCR foi realizada para a confirmação da eficiência dos mesmos. Para isso, uma amostra de DNA da cultivar IAC-Harmonia foi obtida através da metodologia de CTAB descrita por Doyle e Doyle (1990). Basicamente adicionou-se 700 µL do tampão de extração CTAB 2% às amostras maceradas. Os tubos ficaram em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo homogeneizados a cada dez minutos. Posteriormente, foram adicionados 650 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e as lavagens foram repetidas com clorofórmio-álcool isoamílico por mais duas vezes. Da fase superior retirou-se 500 µL e dispensado em um novo tubo, seguido da adição do mesmo volume de álcool isopropílico para precipitar o DNA. O material foi armazenado a -20°C por 15 minutos e centrifugado por cinco minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70%. Para a secagem, a amostra ficou à temperatura ambiente overnight. A amostra foi então ressuspendida em 40 µL de tampão Tris-HCl pH 8,0 tratado com RNase (10 µg/mL). A concentração do DNA foi estimada no Nanodrop .

Para os testes dos *primers* a reação de PCR usada foi a seguinte: 2,5 µL de PCR Buffer (10X); 1,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP's (2,5 mM de cada); 2 µL de *Primer* Forward (5 pmol); 2 µL de *Primer* Reverse (5 pmol), 1 µL de cDNA (20 ng/µL); 0,2 µL Taq Polymerase (50U/1 µL) e 15,3 µL de água DEPC 0,1%. E as condições de amplificação foram: 10 min a 94°C; 40 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C; 7 min a 72°C. Após a reação a qualidade dos produtos foi verificada em gel de agarose 1,5% em 1X TAE buffer e com um padrão de 100 pb de DNA.

4.2.22 Validação das duas bibliotecas subtrativas por RT-qPCR

Após a verificação da eficiência dos *primers* desenhados, amostras de RNAs dos mesmos materiais usados na construção das duas bibliotecas A e B foram obtidas através da metodologia de *Trizol* descrita anteriormente.

Depois de quantificadas, as amostras foram submetidas a um tratamento com DNase a partir do kit da *DNaseI, RNase-Free (Fermentas)*, seguindo recomendações do fabricante.

Para verificar se todo o DNA havia sido degradado da amostra de RNA obtida, uma reação de RT negativo foi realizada. Para isso, uma reação de PCR foi feita usando as amostras de RNA tratadas com *DNaseI*, antes da transcrição reversa. Além disso, uma

amostra de DNA genômico (IAC-Harmonia) foi usada como controle positivo. Qualquer amplificação nas amostras tratadas com *DNaseI* indicaria que o tratamento foi ineficaz e que o RNA ainda contém DNA genômico residual.

Para a validação das bibliotecas subtrativas por RT-qPCR, dois genes de referência foram selecionados: *Actina 21* (F: TGCATACGTTGGTGATGAGG e R: AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG) e *Insulina degradante* (F: GCAACCAACCTTTCATCAGC e R: AGAAATGCCTCAACCCCTTTG). A estabilidade destes genes foi previamente testada para feijoeiro infectado com a raça 73 de *C. lindemuthianum* (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012). Para isso, 100 ng de RNA total tratado com *DNaseI*, de cada amostra foram usados e a amplificação foi feita pelo kit *2X Sensimix™ SYBR & ROX one-Step (Peqlab)*.

Para cada gene, quatro replicatas técnicas foram utilizadas, além disso, para diminuir o erro experimental, as amostras dos dois tratamentos (IAC-Harmonia inoculado x IAC-Harmonia não-inoculado ou IAC-Harmonia Inoculado na presença ou ausência de silício) foram dispostas na mesma placa de PCR. As proporções dos reagentes usados foram as seguintes: 5 µL de 2X Sybr one 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. E as condições de amplificação foram: 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 (com coleta de dados); A curva de Melting divide em três etapas sendo a denaturação 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.

4.2.23 Análise dos dados de expressão

Dentre as diversas metodologias utilizadas para analisar os dados de expressão provenientes de experimentos de tempo real, para a validação das bibliotecas SSH, selecionamos o *software REST 2009 (Qiagen)*.

4.2.24 Programas *LinRegPCR* e *REST*

Depois de prontos, os dados foram analisados pelo programa de regressão linear, chamado de *LinRegPCR* (RAMAKERS et al., 2003). Este programa captura os dados crus que saem do *OneStep* (Applied Biosystems) e faz a correção da baseline que é o valor de fluorescência medida quando ainda não há amplificação do produto específico (fluorescência do cDNA, *primers* e *SYBR Green* não ligados) de cada amostra. Além disso, ele constrói através da curva de amplificação de cada amostra uma regressão linear onde define os melhores pontos para cada curva de acordo aos dados melhor correlacionados. Com base nisso, obtém-se o valor do threshold, o ciclo de quantificação (Cq) e reta cuja inclinação é utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação (E). Os valores ideais de E podem variar de 1,8 a 2 e o valor ideal da correlação é $R \geq 0,995$. A eficiência média por amostra e o valor de Ct são usados para calcular a concentração inicial do gene avaliado por amostra.

Posteriormente, utilizamos o programa *Relative Expression Software Tool -REST 2009* (Qiagen) descrito por PFAFFL; HORGAN; SCHILDER (2002), para realizar os estudos de expressão. Este programa usa o modelo matemático baseado nas eficiências da PCR entre a amostra e o controle. Basicamente, o *REST* usa para os cálculos o valor da expressão gênica do alvo normalizada pela expressão do gene de referência (controle interno). O programa *REST* compara ainda os valores de Cq do controle e tratamento (amostra). Esse método pode ser considerado mais apropriado, pois além de avaliar a expressão gênica ele ainda fornece dados com significância estatística, que traz mais segurança na observação da diferença de expressão entre genes ou tratamentos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Sequenciamento e bioinformática

O sequenciamento das dez placas de cada uma das bibliotecas SSH foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG – na UNICAMP. Um banco de dados contendo todas as informações das sequências foi criado e está inserido no site <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/TS/>. Este site ainda está protegido, mas assim que os dados

forem publicados, ele se tornará público e suas as sequências serão depositadas em bancos de dados internacionais.

Na Figura 20 é possível visualizar o relatório do sequenciamento das placas de cada biblioteca. Nesta página é visualizada a identificação das placas, a porcentagem de eficiência do sequenciamento de cada placa (considerando sequências com no mínimo 350 nucleotídeos com “*Phred Quality*” ≥ 20), um *link* para as sequências FASTA, para as qualidades de cada uma das sequências e um link para obtenção dos cromatogramas. Para distinguir as bibliotecas, a Biblioteca A (subtração de amostra inoculada pela não-inoculada) contendo fragmentos mais longos (acima de 1000 pb) foi chamada de TSCCLO1, e a de fragmentos curtos (menores que 1000 pb) de TSCCSH1, ambas com placas indo de 001 a 005. Já a Biblioteca B (subtração de amostra inoculada e suplementa com Si pela amostra controle apenas inoculada) contendo fragmentos longos foi chamada de TSCCSL1, e a de fragmentos curtos, de TSCCSS1, também ambas com placas indo de 001 a 005.

1.	2010-04-06.230002-1270605602 - (TSCCLO1001 - b) - 77.1%
2.	2010-04-12.231501-1271124901 - (TSCCLO1002 - b) - 79.2%
3.	2010-04-15.143002-1271352602 - (TSCCSH1002 - b) - 92.7%
4.	2010-04-15.171502-1271362502 - (TSCCSH1005 - b) - 85.4%
5.	2010-04-15.201502-1271373302 - (TSCCLO1003 - b) - 87.5%
6.	2010-04-15.230001-1271383201 - (TSCCLO1004 - b) - 93.8%
7.	2010-04-16.083002-1271417402 - (TSCCSH1001 - b) - 87.5%
8.	2010-04-20.173002-1271795402 - (TSCCLO1005 - b) - 91.7%
9.	2010-04-20.201501-1271805301 - (TSCCSH1003 - b) - 81.2%
10.	2010-04-20.231501-1271816101 - (TSCCSH1004 - b) - 86.5%
11.	2011-02-02.200001-1296684001 - (TSCCSS1001 - b) - 38.5%
12.	2011-02-07.183002-1297110602 - (TSCCSL1001 - b) - 71.9%
13.	2011-02-24.080002-1298545202 - (TSCCSL1002 - b) - 54.2%
14.	2011-02-24.080018-1298545218 - (TSCCSS1002 - b) - 69.8%
15.	2011-03-04.014501-1299213901 - (TSCCSL1003 - b) - 81.2%
16.	2011-03-04.044501-1299224701 - (TSCCSL1004 - b) - 74.0%
17.	2011-03-10.234501-1299811501 - (TSCCSL1005 - b) - 69.8%
18.	2011-03-15.001501-1300158901 - (TSCCSS1003 - b) - 74.0%
19.	2011-03-18.181502-1300482902 - (TSCCSS1004 - b) - 74.0%
20.	2011-03-18.211501-1300493701 - (TSCCSS1005 - b) - 70.8%

Figura 20 - Total de placas sequenciadas e porcentagem de aproveitamento de cada uma delas

As dez placas sequenciadas por biblioteca apresentaram um bom índice de sequências boas ou válidas (com no mínimo 350 bases com alta qualidade), sendo que a maior foi de 93,8% (TSCCLO1004) e a menor de 38,5% (TSCCSS1001). A qualidade das sequências pode

ser visualizada também no *site* (Figura 21). 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.

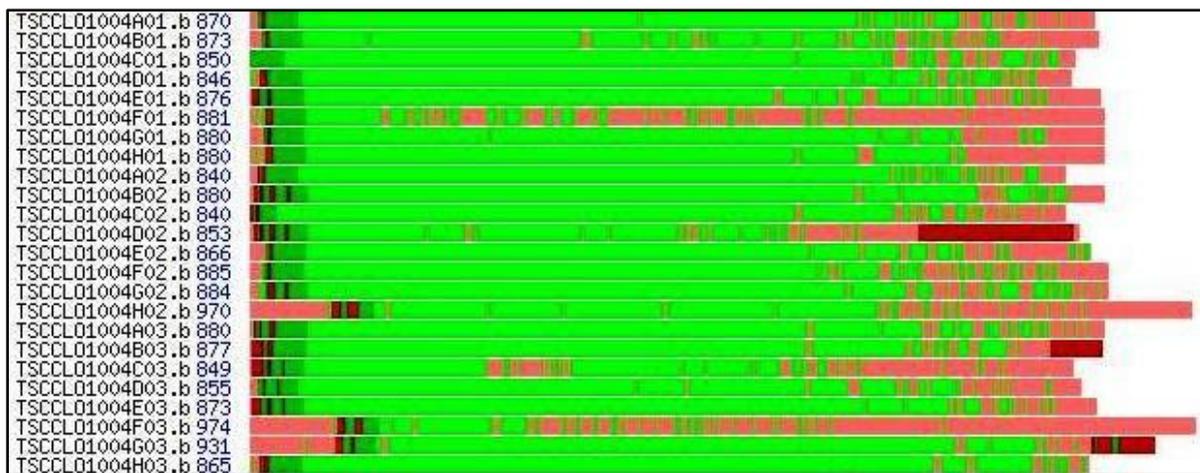


Figura 21 - Análise visual das qualidades de cada *read* em uma placa sequenciada. Na figura, em verde claro encontram-se bases com qualidade *Phred* >20 ; em rosa, bases com qualidade *Phred* < 20 ; em verde e vermelho escuros estão bases mapeadas com sendo do vetor de clonagem, e em azul, o tamanho de cada *read* em bases

O agrupamento de sequências iguais ou pertencentes a um mesmo gene é um processo conhecido como clusterização. A clusterização agrupa por homologia várias sequências em um mesmo grupo que representa um gene, e este grupo é chamado de *cluster*. Sequências únicas, que não se encaixaram em nenhum outro grupo de sequências e representam por si só um gene são chamadas de *singlets*. Assim, *contigs* são representações dos genes expressos por um organismo em uma determinada situação e são formados pela soma de *singlets* e *clusters*, cada um representando um único gene. Quanto maior o número de sequências que formam um *cluster*, maior se espera que seja a expressão desse gene no momento de coleta do material.

No total, foram obtidas 1703 sequências, inicialmente clusterizadas automaticamente em 1369 *contigs* ou sequências diferentes, sendo estes *contigs* compostos por 1203 *singlets*, ou seja, sequências de genes que apareceram uma vez apenas, ou que não foram agrupados junto a outras sequências. Esses *singlets* foram divididos em 647 sequências originárias da Biblioteca A e 556 sequências vindas da biblioteca B. A outra parte da composição dos

contigs foi formada por 166 *clusters* contendo duas ou mais sequências, sendo 72 *clusters* na biblioteca A e 94 na biblioteca B.

Como referido anteriormente, as sequências geradas pela biblioteca subtrativa foram digeridas antes da clonagem, então é muito provável que diferentes *clusters* ou *singlets* representem, mesmo após a clusterização, um mesmo gene. Para reduzir esta redundância, o banco foi clusterizado novamente usando sequências-molde de genes de soja do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/48389>). Após a nova análise, as sequências-molde de soja foram retiradas da contagem de cada *cluster*, e o resultado final indicou com maior precisão a frequência com que um gene apareceu na biblioteca. O número de *contigs* totais foi reduzido na Biblioteca A de 719 para 575. Além disso, o que também indicou a queda na redundância foi a diminuição no número de reads não-agrupados, ou *singlets*, de 647 para 453 na biblioteca A, e o aumento do número de *clusters*, de 72 para 122, como apresentado na Figura 22.

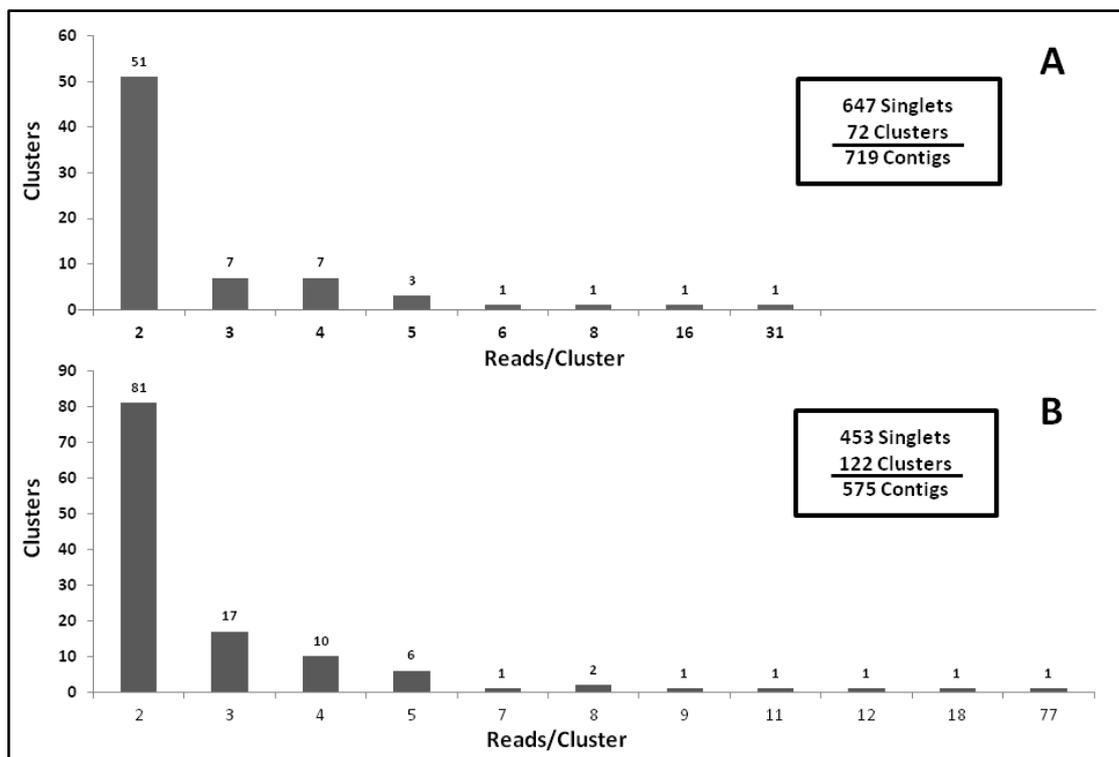


Figura 22 - Distribuição geral dos clusters para a Biblioteca A, antes (A) e depois (B) da reclusterização usando sequências de *G. Max* como molde

Na biblioteca B a nova clusterização reduziu o número de *contigs* totais de 650 para 500. A diminuição no número de *singlets* foi de 556 para 395, e o aumento do número de *clusters*, de 94 para 105, como pode ser visto na Figura 23.

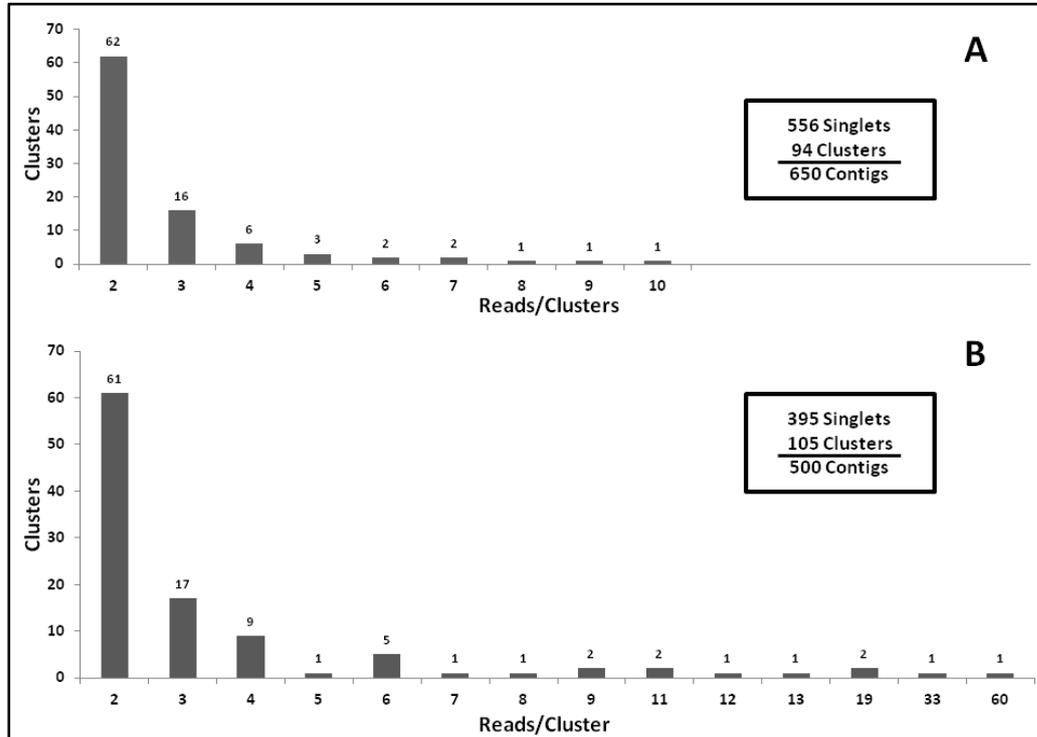


Figura 23 - Distribuição geral dos clusters para a Biblioteca B, antes (A) e depois (B) da reclusterização usando sequências de *G. Max* como molde

Os *contigs* resultantes da análise final representam alguns dos genes diferencialmente expressos nas bibliotecas. Apenas uma pequena fração destes genes foi encontrada em ambas as bibliotecas, mostrando a eficiência da técnica de SSH em selecionar genes diferencialmente expressos em cada uma das situações (Figura 24).

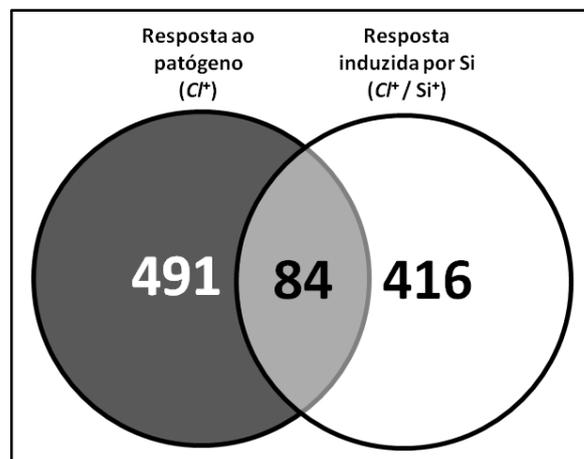


Figura 24 - Diagrama mostrando o número de sequências comuns ou exclusivas de cada uma das bibliotecas

Os *contigs* mais frequentes nas Bibliotecas **A** e **B** podem ser encontrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - *Contigs* mais frequentes na Biblioteca A

Contig	Reads	e-value	G. max GI	Descrição
Contig12673 / Contig9448	77	0	Glyma14g07270.1	<i>Rubisco Activase</i>
Contig12788	18	0	Glyma11g08730.1	<i>Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein</i>
Contig8858	12	0	Glyma09g08100.2	<i>Cysteine proteinases superfamily protein</i>
Contig12587	11	0	Glyma06g15540.1	<i>Photosystem I reaction center subunit PSI-N, chloroplast, putative / PSI-N</i>
Contig12817	9	0	Glyma05g25860.2	<i>Unknown</i>
Contig12573	8	e-177	Glyma16g04940.1	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2</i>
Contig12658	8	e-150	Glyma11g00810.3	<i>O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1</i>
Contig4583	7	0	Glyma04g01920.1	<i>Catalase 2</i>
Contig12767 / Contig12781 / Contig9760	5	0	Glyma19g06370.1	<i>Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein</i>
Contig12760	5	0	Glyma08g18510.1	<i>Photosystem II subunit R</i>
Contig1132 / Contig12706	5	e-146	Glyma07g05320.2	<i>Photosystem I light harvesting complex gene 2</i>
Contig2792 / Contig9493	5	0	Glyma17g04330.1	<i>S-adenosylmethionine synthetase family protein</i>
Contig12577	5	e-108	Glyma20g23420.1	<i>Glutathione S-transferase TAU 8</i>
Contig9851	5	e-144	Glyma05g03730.1	<i>PGR5-LIKE A</i>
Contig12641	4	0	Glyma10g03750.1	<i>Photosystem II reaction center W</i>
Contig12790	4	0	Glyma05g09390.1	<i>Ferredoxin/thioredoxin reductase subunit A (variable subunit) 2</i>
Contig1723	4	0	Glyma02g35990.1	<i>Ubiquitin E2 variant 1D-4</i>
Contig12625	4	e-172	Glyma15g11490.2	<i>ATPase, F1 complex, gamma subunit protein</i>
Contig12586	4	0	Glyma15g17070.2	<i>FTSH protease 8</i>
Contig12716	4	0	Glyma12g04150.1	<i>Fructose-bisphosphate aldolase 2</i>
Contig12589	4	e-143	Glyma12g35070.1	<i>Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs</i>
Contig12632	4	0	Glyma16g10880.1	<i>1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase</i>
Contig12674	4	e-110	Glyma01g02180.1	<i>PLATZ transcription factor family protein</i>
Contig442	4	e-158	Glyma16g34560.1	<i>NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein</i>

Tabela 10 - *Contigs* mais frequentes na Biblioteca B

Contig	Reads	e-value	G. Max GI	Descrição
Contig12767 / Contig12781 / Contig9760	60	0	Glyma19g06370.1	<i>Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein</i>
Contig12817	33	0	Glyma05g25860.2	<i>Unknown</i>
Contig12673 / Contig9448	19	0	Glyma14g07270.1	<i>Rubisco activase</i>
Contig12760	19	0	Glyma08g18510.1	<i>Photosystem II subunit R</i>
Contig12755	13	0	Glyma15g43100.1	<i>Photosystem II 5 kD protein</i>
Contig12422 / Contig12762	12	e-141	Glyma16g28030.1	<i>Light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1</i>
Contig219	11	0	Glyma07g14340.2	<i>Photosystem II subunit Q-2</i>
Contig12703 / Contig12778	11	e-15	Glyma15g15140.1	<i>Unknown</i>
Contig12788	9	0	Glyma11g08730.1	<i>Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein</i>
Contig8858	9	0	Glyma09g08100.2	<i>Cysteine proteinases superfamily protein</i>
Contig9933	8	e-142	Glyma16g28070.1	<i>Light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1</i>
Contig12731	7	0	Glyma16g01870.1	<i>Photosystem I light harvesting complex gene 2</i>
Contig12641	6	0	Glyma10g03750.1	<i>Photosystem II reaction center W</i>
Contig12790	6	0	Glyma05g09390.1	<i>Ferredoxin/thioredoxin reductase subunit A (variable subunit) 2</i>
Contig6478	6	e-172	Glyma16g25860.1	<i>Photosystem II subunit O-2</i>
Contig12583	6	0	Glyma16g26130.1	<i>Photosystem I light harvesting complex gene 1</i>
Contig12794	6	e-128	Glyma14g03560.1	<i>Photosystem II subunit P-1</i>
Contig1132 / Contig12706	5	e-146	Glyma07g05320.2	<i>Photosystem I light harvesting complex gene 2</i>
Contig12587	4	0	Glyma06g15540.1	<i>Photosystem I reaction center subunit PSI-N, putative / PSI-N, putative</i>
Contig9935	4	0	Glyma19g41090.1	<i>Glycosyl hydrolase superfamily protein</i>
Contig12829	4	e-131	Glyma09g09940.1	<i>Gamma-soluble NSF attachment protein</i>
Contig6734	4	e-151	Glyma14g05390.1	<i>Ethylene-forming enzyme</i>
Contig9337	4	0	Glyma04g01840.6	<i>High mobility group B2</i>
Contig9858	4	0	Glyma12g29110.1	<i>2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein</i>
Contig12815 / Contig12849	4	0	Glyma16g05350.1	<i>CCR-like</i>

4.3.2 Categorização dos genes pelo programa *Gene Ontology*

Existem numerosos sistemas de classificação funcional disponíveis, 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/) e *GOSlimViewer* (http://agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer_select.pl), que restringe a pesquisa ao banco de dados de plantas. Este programa classifica os genes e produtos gênicos, fornecendo uma ontologia de termos definidos. Essa ontologia abrange três categorias: componente celular (localização nuclear, organelar ou citossólica ou mesmo em membranas); função molecular (as atividades elementares de um gene, a nível molecular, como catálise ou ligação); e processo biológico (operações ou eventos moleculares com um início e fim definido, pertinentes ao funcionamento de unidades vivas como células, tecidos, órgãos e organismos). O banco de dados de sequências clusterizadas das Bibliotecas A e B foram submetidas à categorização através do programa *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>).

A Figura 25 mostra o número de ontologias encontradas para cada sequência depositada no banco de dados. Podemos observar um grande número de sequências sem anotação nas duas bibliotecas (aproximadamente 150 na Biblioteca A e 110 na Biblioteca B), mostrando um padrão já esperado para as leguminosas, uma vez que ainda existem poucas sequências depositadas no *NCBI*, usado como base neste trabalho.

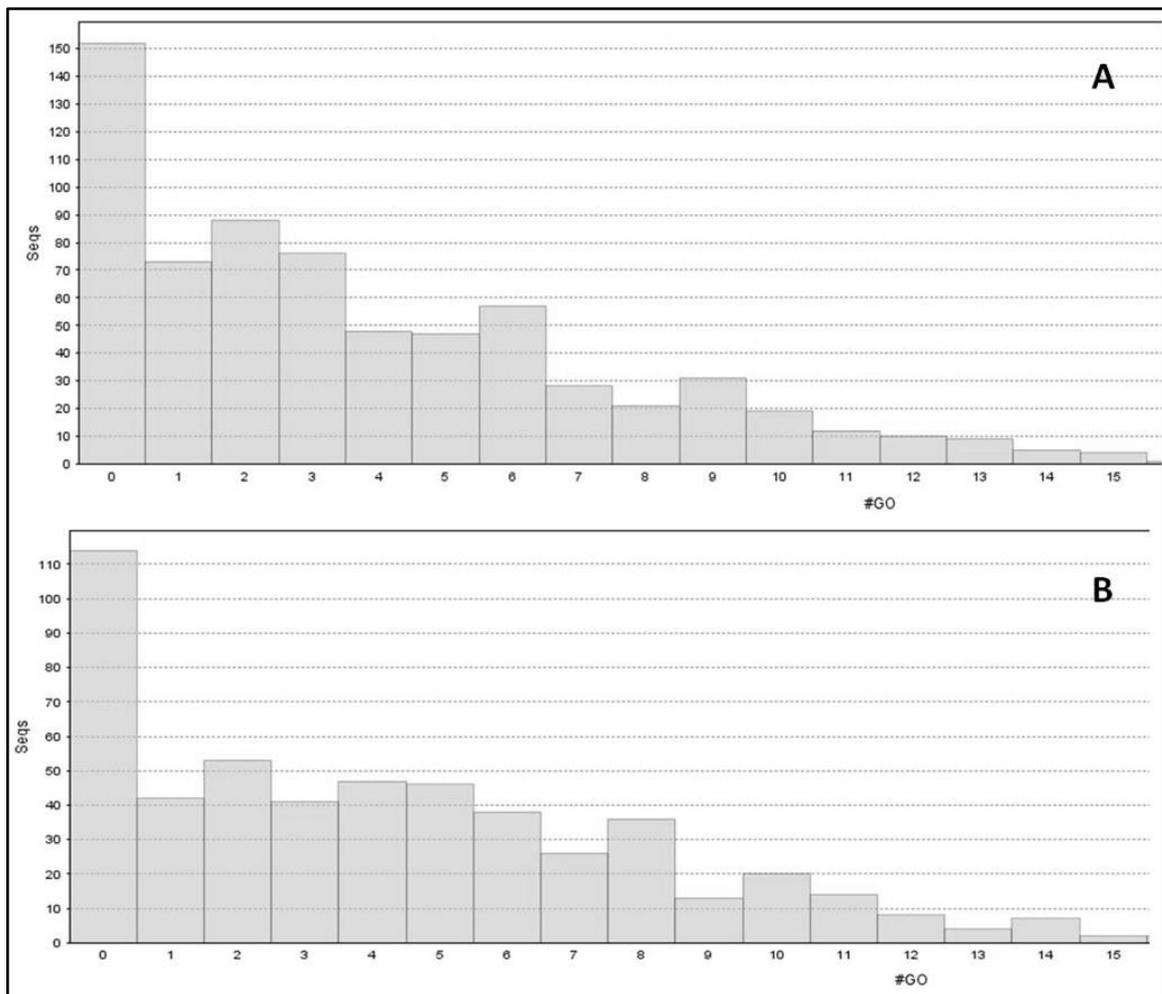


Figura 25 - Número de ontologias encontradas para cada sequência depositada no banco de dados

Podemos observar também que um grande número de sequências foi classificado em mais de uma ontologia. Isto acontece, pois o *GO* trabalha baseado em um sistema de três nós (Processo Biológico; Função Molecular e Componente Celular), onde cada sequência depositada pode ser inserida em uma, duas ou três funções. Além disso, o *GO* usa como base sequências depositadas no *NCBI* onde a descrição do gene é feita pelo agente que deposita a sequência no banco. Desta forma, diversas classificações podem então ser atribuídas a uma única sequência, o que explicaria assim o grande número de classificações para a mesma sequência. A forma mais usual de diminuir o número de sequências não anotadas e de sequências classificadas em diferentes categorias seria a realização de uma anotação manual das duas bibliotecas. Porém, o tempo gasto com este tipo de trabalho inviabilizaria esta anotação. Dados similares a estes também foram encontrados por Recchia (2011).

A frequência mais elevada de processos biológicos mapeados para a biblioteca A se alocou na categoria de resposta a estresses, o que era esperado (Figura 26). Os processos fotossintéticos e relacionados à produção de energia também indicam ser bastante alterados durante a infecção, assim como processos catabólicos e de transporte.

Na Biblioteca B, as categorias de genes ligados à fotossíntese e formação de precursores de metabólitos e energia foram as mais frequentes, seguidos por processos catabólicos e de transporte. É interessante observar que a categoria de resposta a estímulos bióticos recebeu apenas genes vindos da biblioteca inoculada, mas esta também possui muitos genes categorizados em resposta a estresses abióticos, assim como a biblioteca com suplemento de Si. Isso pode mostrar uma regulação de genes mais específicos ligados ao estresse bióticos do que ao abiótico.

Estudos similares com outras espécies mostraram tendências similares para os respectivos tratamentos. Através da análise de transcrito de plantas de trigo infectadas com *Blumeria graminis* f. SP. *Tritici* e tratadas com 1,7 mM de silicato de potássio, também foi possível observar que diversos genes envolvidos nos processos metabólicos primários como energia foram regulados positivamente. Segundo os autores, patógenos interferem nos processos metabólicos das plantas, como fotossíntese e metabolismo de energia como glicólise, fixação de carbono, fosforilação oxidativa, derivando recursos para seu próprio desenvolvimento, o que requer um maior dispêndio energético da planta para suprir a sua própria demanda (FAUTEUX et al., 2006; CHAIN et al., 2009).

Já para a classificação de função molecular, os genes mais induzidos nas Bibliotecas A e B parecem estar ligados ao processo de defesa como hidrolases, e ligações a nucleotídeos e proteínas (Figura 27). Interessante notar que as categorias de ligação a sequências específicas e de transdução de sinal receberam apenas genes vindos da biblioteca inoculada, sendo estes realmente funções relacionadas ao mecanismo de defesa à infecção.

As diferenças entre os resultados das duas bibliotecas levaram à seleção de genes diferenciados para a validação de cada uma. Os genes que validaram as duas bibliotecas também analisados em escala temporal pela técnica de *RT-qPCR*.

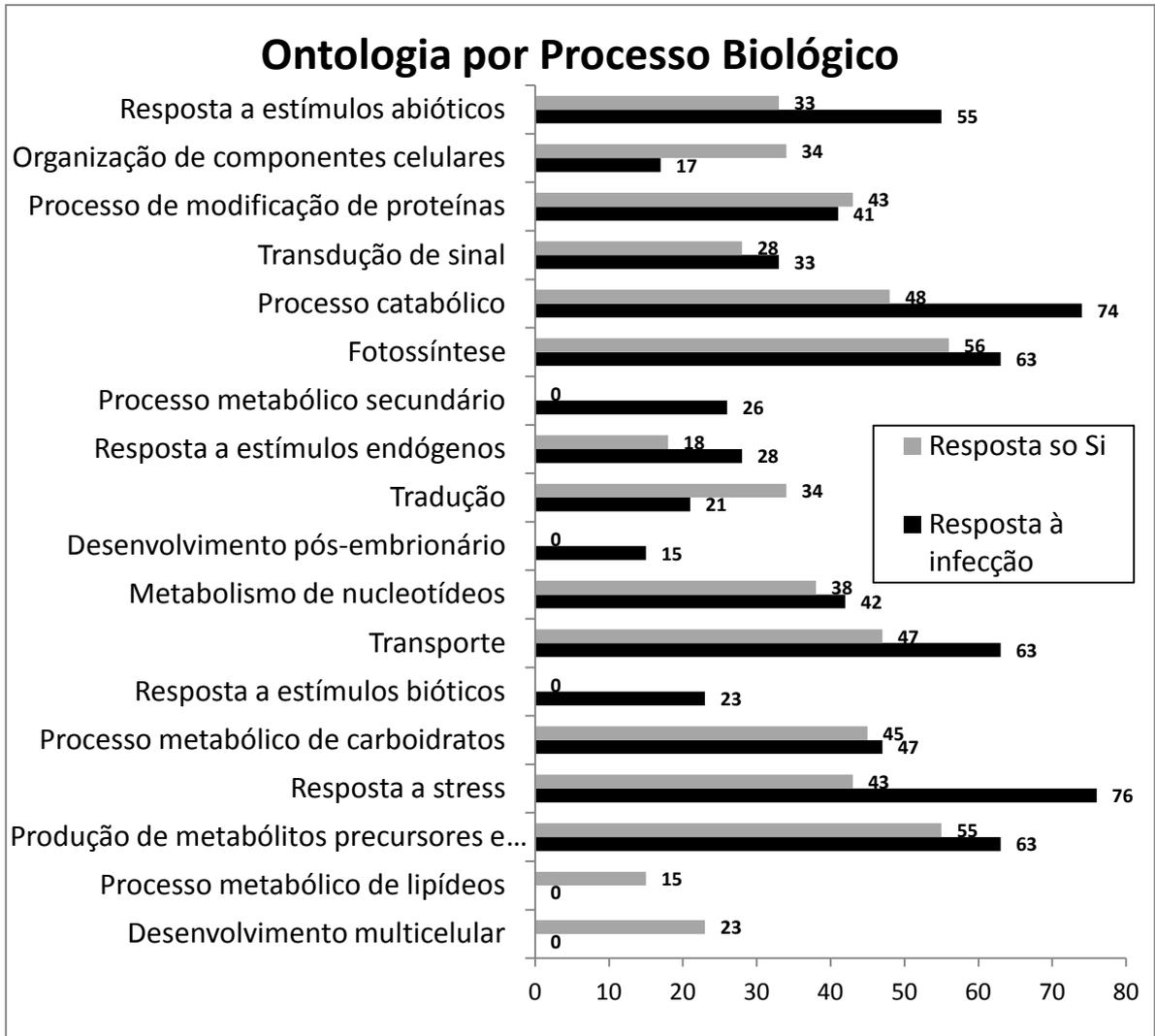


Figura 26 - Classificação, segundo o *software GO*, das sequências das duas bibliotecas, pelo Processo Biológico

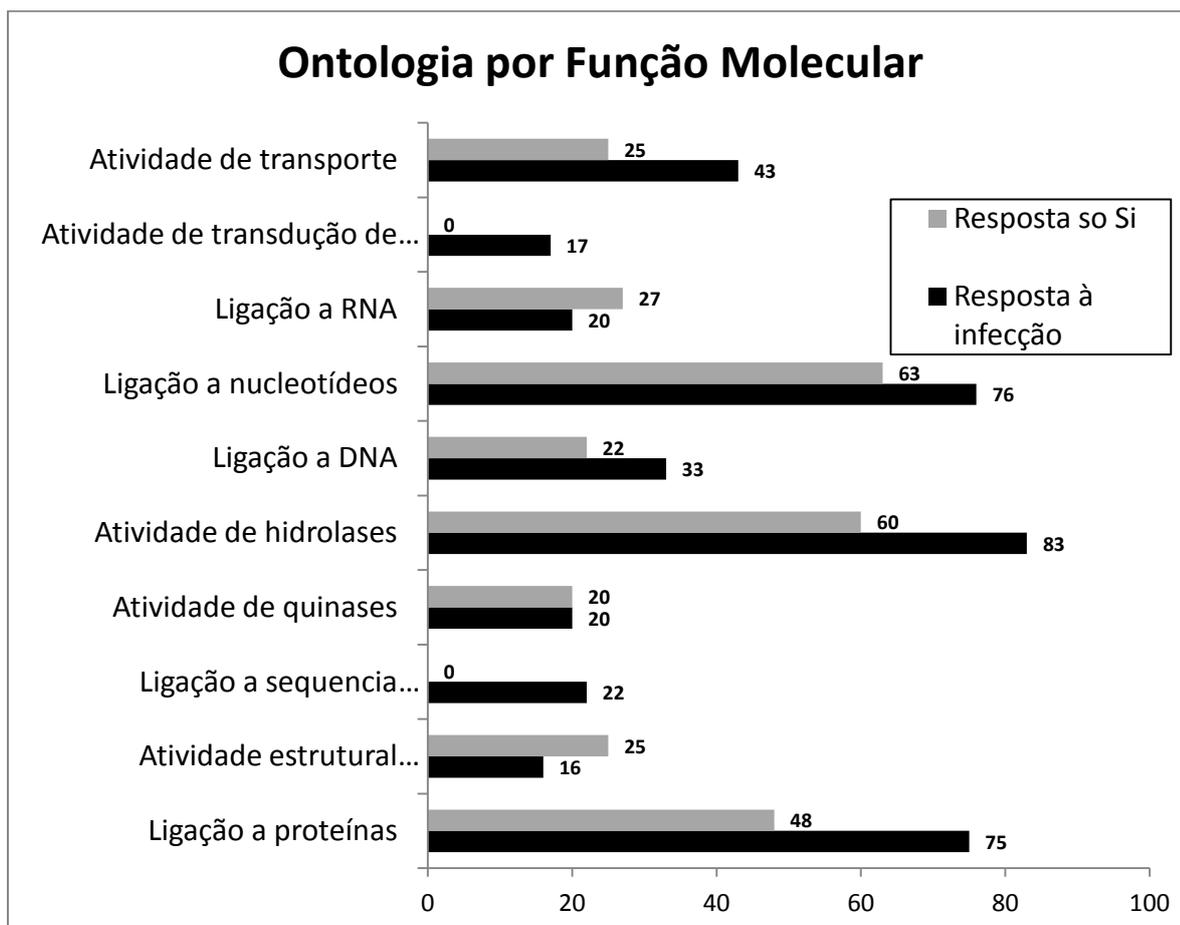


Figura 27 - Classificação, segundo o *software* GO, das sequências das duas bibliotecas, por Função Molecular

4.3.3 Validação das bibliotecas por RT-qPCR

A validação das bibliotecas SSH foi realizada para comprovar que a hibridização subtrativa realmente representa genes que tem sua expressão alterada em função dos tratamentos.

Neste caso, os mesmos materiais vegetais usados na construção das bibliotecas SSH foram utilizadas para a extração de um novo RNA. Estes foram então submetidas ao tratamento com DNase seguido do RT negativo. A Figura 28 mostra que o tratamento com a enzima foi eficaz e que todas as amostras estavam livres de DNA e poderiam por isso serem usadas no experimento de qPCR.

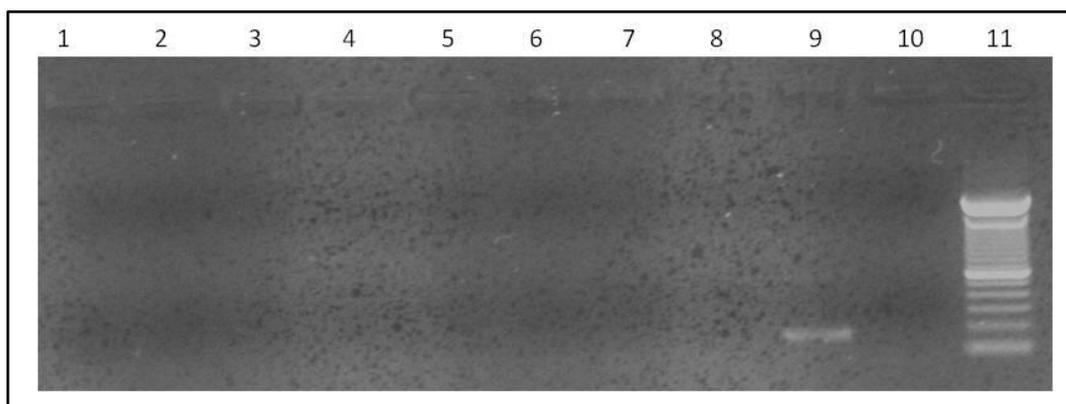


Figura 28 - Resultado de PCR “RT negativo” em gel de agarose 1%. De 1 a 8, reação de PCR para o gene Actina 21, usando como template RNA das amostras tratados com DNaseI; em 9, reação de PCR para o gene Actina 21, usando como template uma amostra de DNA genômico (controle positivo); em 10, reação em branco; e em 11, marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

Depois disso, os *primers* selecionados foram então utilizados na validação das bibliotecas. Desta forma, foram analisadas as expressões relativas para 15 transcritos de cada biblioteca.

Através dos programas *LinReg PCR (11.0)* e *REST 2009 (Qiagen)* foi possível determinar a expressão relativa (*ER*) dos genes para validação das bibliotecas (Figuras 29 e 30). Para o cálculo da *ER* no programa *REST* foi realizada a razão entre inoculado / não inoculado para a biblioteca A, e inoculado + Si / inoculado sem Si, na biblioteca B.

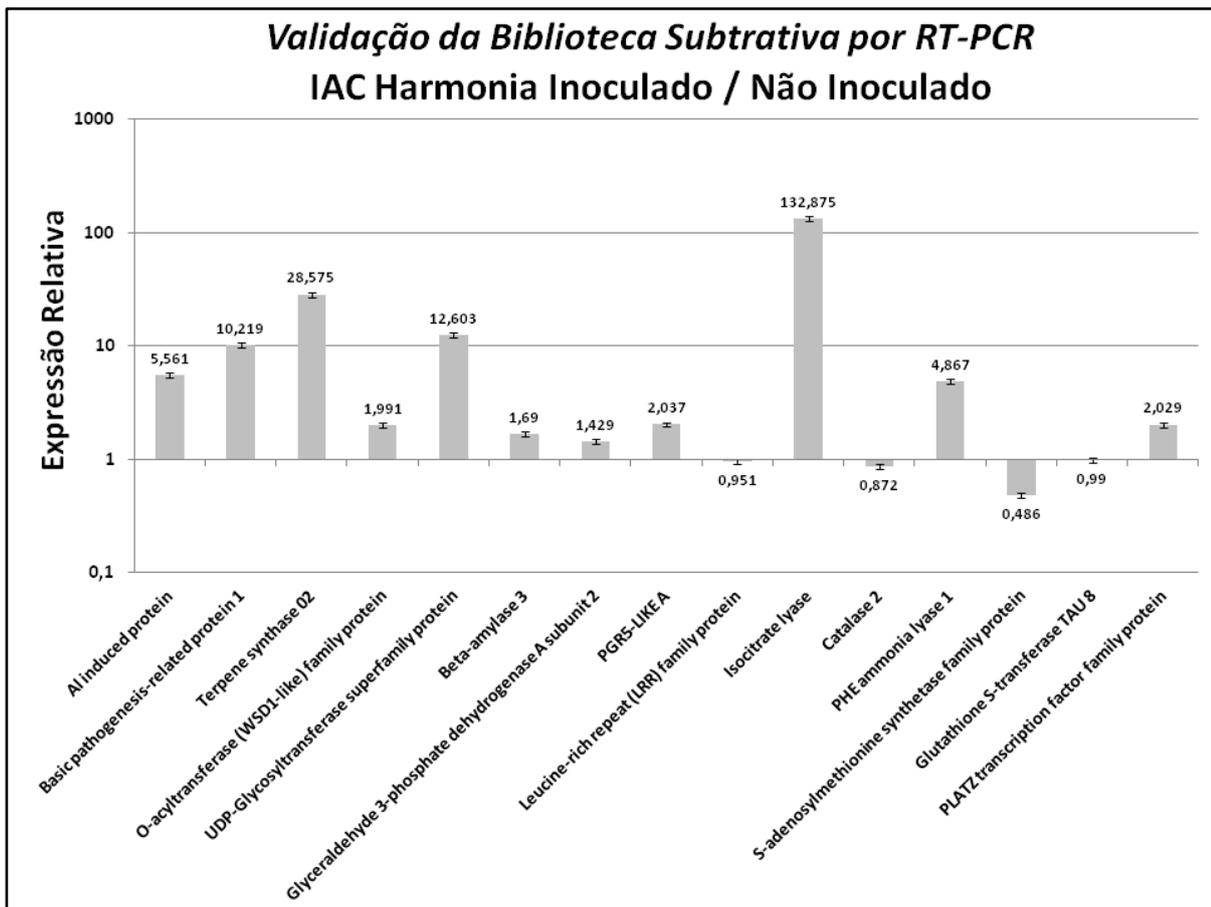


Figura 29 - Expressão relativa (ER) dos genes selecionados para a validação da Biblioteca A

Na validação da Biblioteca A (Figura 29), as amplificações positivas dos transcritos variaram de 1,4 a 132 vezes. Essas variações podem nos indicar uma maior ativação destes transcritos durante o processo de infecção sofrido pela planta. Dentre os 15 genes avaliados, 11 mostraram um perfil de indução esperado.

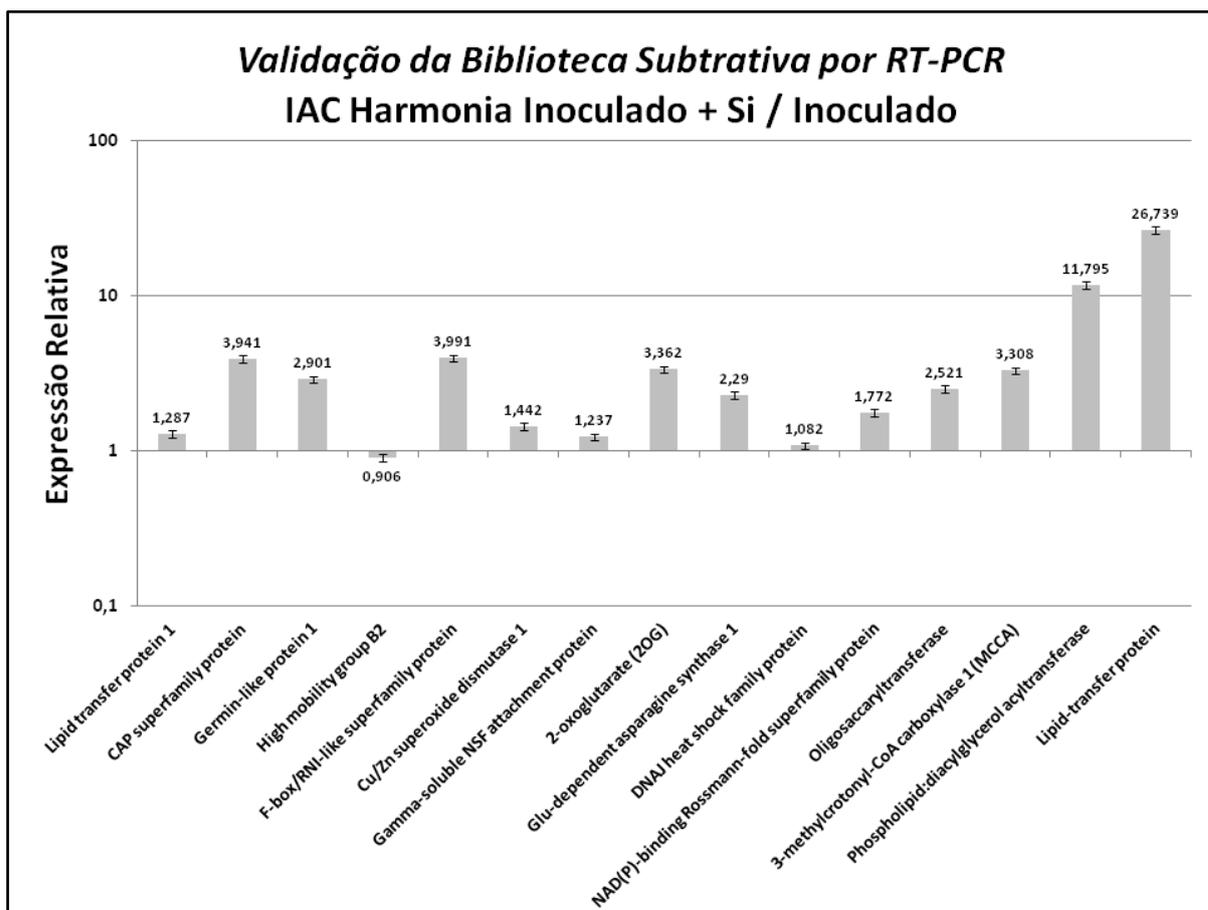


Figura 30 - Expressão relativa (ER) dos genes selecionados para a validação da Biblioteca B

A alteração positiva dos transcritos para a Biblioteca B (Figura 30), variou de 1,08 a cerca de 27 vezes. Dos 15 genes avaliados, apenas para um não houve indução. Podemos observar que a alteração positiva dos genes não alterou de forma tão alta quando as observadas para a biblioteca A. Isto pode ser uma consequência racional desta biblioteca: os genes aqui induzidos pelo ataque do patógeno com suplemento de Si foram normalizados pelas respectivas expressões em amostras também inoculadas, porém não suplementadas. Uma pequena indução neste experimento pode ser fruto de uma normalização de um gene que foi um pouco induzido na amostra inoculada e um pouco mais induzido com a adição de Si, ou altamente induzido pelo ataque e com uma expressão ainda maior quando Si foi adicionado ao substrato. O importante aqui é ver a tendência de uma maior expressão em genes relacionados à defesa da planta e que também respondam, em certo grau, ao Si.

Estes resultados demonstram que a técnica de SSH foi eficaz na seleção de transcritos diferencialmente expressos tanto na biblioteca A quanto na B. Podemos concluir que estes transcritos que mostraram um acréscimo no valor da sua expressão, em relação ao controle de cada tratamento, podem ser utilizados para o experimento de análise temporal onde se tem por objetivo, identificar o padrão de expressão destes transcritos em diferentes períodos após a infecção pelo patógeno.

4.4 CONCLUSÕES

- A técnica de SSH foi ideal para a seleção de genes diferencialmente expressos durante os dois tratamentos;
- Foi gerado um banco de sequências (que futuramente será disponível publicamente) que possibilitará mais estudos futuros;
- Este banco possui 1703 sequências de feijoeiro em resposta ao ataque pelo fungo *C. lindemuthianum* (raça 65), com ou sem suplemento de Si, agrupadas em 991 *contigs* ou sequências únicas;
- O sucesso de sequenciamento da biblioteca foi de 88,7% (1703 reads bons / 1920 reads totais);
- Das 991 sequências únicas, apenas 84 foram encontrados em ambas as bibliotecas;
- Dentre os 15 genes avaliados para a validação da Biblioteca A, onze confirmaram os resultados, enquanto que para a Biblioteca B, 14 entre 15 genes avaliados corresponderam ao esperado;

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BORGES, A., TSAI, S.M. CALDAS, D.G.G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 827–838, 2012.
- CHAIN, F., CÔTÉ-BEAULIEU, C., BELZILE, F., MENZIES, J.G., BÉLANGER, R.R. A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 22, n. 11, p. 1323-1330, 2009.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y.-F.C., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D., SIEBERT, P.D. 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, v. 93, p. 6025-6030, 1996.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FAUTEUX, F., RÉMUS-BOREL, W., MENZIES, J.G., BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.
- FAUTEUX, F., CHAIN, F., BELZILE, F., MENZIES, J.G., BÉLANGER, R.R. The protective role of silicon in the Arabidopsis-powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.
- FERNANDES, C.F., VIEIRA JÚNIOR, J.R., da SILVA, D.S.G., REIS, N.D., ANTUNES JÚNIOR, H. Mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Documentos/EMBRAPA**, Rondônia, n. 133, p. 1-14, 2009.
- GHAREEB, H., BOZSÓ, Z., OTT, P.G., REPENNING, C., STAHL, F., WYDRA, K. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates the priming effect. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, p. 83-89, 2011.
- GOUSSAIN, M.M., MORAES, J.C., CARVALHO, J.G., NOGUEIRA, N.L., ROSSI, M.L. Efeito e aplicação de silício em plantas de milho no desenvolvimento biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 305-310, 2002.
- GUÉVEL, M.H., MENZIES, J.G., BÉLANGER, R.R. Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 429-436, 2007.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

HUANG, X., MADDAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 868-77, 1999.

MILES, T.D., DAY, B., SCHILDER, A.C. Identification of differentially expressed genes in a resistant versus a susceptible blueberry cultivar after infection by *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, n.5, p. 463-477, 2011.

PFÄFFL, M.W., HORGAN, G.W., DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e. 36, 2002.

RAMAKERS, C., RUIJTER, J.M., LEKANNE DEPREZ, R.H., MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 39, p. 62-66, 2003.

RECCHIA, G.H. **Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvidos na resistência ao estresse hídrico**. 2011. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODRIGUES, F.A; de OLIVEIRA, L.A., KORNDÖRFER, A.P., KORNDÖRFER, G.H. Silício: um elemento benéfico e importante para as plantas. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n. 134, p. 14-20, 2011.

SCHEFE, J.H., LEHMANN, K.E., BUSCHMANN, I.R., UNGER, T., FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_T difference” formula. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, p. 10, 2006. DOI 10.1007/s00109-006-0097-6

SEEBOLD, K.W., DATNOFF, L.E., CORREA-VICTORIA, F.J., KUCHARÉK, T.A., SNYDER, G.H. Effect of silicon rate and host resistance on blast, scald and yield of upland rice. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n, 8, p. 871-876, 2000.

SEEBOLD, K.W., KUCHARÉK, T.A., DATNOFF, L.E., CORREA-VICTORIA, F.J., MARCHETTI, M.A. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars in rice. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2001

SINGH, K., NIZAM, S., SINHA, M., VERMA, P.K. Comparative transcriptome analysis of the necrotrophic fungus *Ascochyta rabiei* during oxidative stress: Insight for fungal survival in the host plant. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2012. e33128. doi:10.1371/journal.pone.0033128

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

UDVARDI, M.K., CZECHOWSHI, T., SCHEIBLE, W.R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, p. 1736-1737, 2008.

5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR *C. LINDEMUTHIANUM*, E SUPLEMENTO DE SILÍCIO.

RESUMO

Doze genes foram selecionados para serem analisados em função de sua resposta à infecção da planta de feijoeiro pelo fungo *C. lindemuthianum*, com ou sem suplemento de Si, utilizando *RT-qPCR*. No estudo da resposta ao ataque do patógeno, as expressões relativas foram analisadas a partir de amostras coletadas de plantas inoculadas com o patógeno normalizadas pela expressão nos controles. Para o estudo de genes possivelmente modulados pelo suplemento de Si, as expressões relativas foram analisadas pela diferença entre plantas inoculadas com o patógeno e suplementadas com Si normalizadas por plantas inoculadas, porém sem acréscimo de Si. As amostras foram coletadas 6, 48 e 72 horas após inoculação para avaliar genes possivelmente relacionados à defesa. O inóculo alterou positivamente a expressão de sete genes (*Basic Pathogenesis-related Protein 1*, *Terpene synthase*, *Isocitrate lyase*, *PHE Ammonia Lyase 1*, *High Mobility Group*, *2-oxoglutarate* e *NAD(P)-binding protein*), enquanto o tratamento com 75 ppm de Si alterou positivamente oito genes (*Terpene synthase*, *Isocitrate lyase*, *Catalase*, *High Mobility Group*, *DNAJ HSP*, *NAD(P)-binding protein*, *Lipid-transfer protein* e *P. vulgaris Lsi2-like*), em pelo menos um dos tempos avaliados. Apesar de dois genes responderem apenas ao ataque do patógeno (*Basic PRI* e *2-OG*) e outros quatro responderem apenas ao acréscimo de Si (*Lsi2*, *DNAJ*, *Lipid Transfer* e *Catalase*), outros quatro genes (*High Mobility group*, *Terpene synthase*, *Isocitrate lyase*, e *NAD(P)-binding protein*) mostraram responder ao ataque do patógeno e também ao Si, mostrando que este mineral pode estar envolvido na resposta de defesa da planta não só por formação de barreiras físicas, mas também pela modulação de genes relacionados à defesa.

Palavras-chave: Feijoeiro. Antracnose. *C. lindemuthianum*. Silício. Expressão Gênica.

ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO *C. LINDEMUTHIANUM* AND SILICON

ABSTRACT

Twelve genes were selected for analysis based on their response to infection by the common bean fungus *C. lindemuthianum*, with or without supplemental Si, using RT-qPCR. In the study of the response to this pathogen, relative expressions levels were determined for samples collected from plants inoculated with the pathogen and normalized by the expression of their controls. For the study of genes potentially modulated by supplemental Si, expression was analyzed by the relative difference between plants inoculated with the pathogen and supplemented with Si and normalized by inoculated plants, but without addition of Si. Samples were collected at 6, 48 and 72 hours after inoculation to evaluate genes possibly involved in the defense. The inoculum positively altered the expression of seven genes (Basic Pathogenesis-Related Protein 1, Terpene synthase, Isocitrate lyase, PHE Ammonia lyase 1, High Mobility Group, 2-oxoglutarate and NAD (P)-binding protein), while treatment with 75 ppm Si positively altered eight genes (Terpene synthase, Isocitrate lyase, Catalase, High Mobility Group, DnaJ HSP, NAD (P)-binding protein, Lipid-transfer protein and *P. vulgaris* LSI2-like), in at least one of the times evaluated. Although only two genes respond to this pathogen (Basic PR1 and 2-OG) and four others respond only to the addition of Si (LSI2, DnaJ, Catalase and Lipid Transfer), four other genes (High Mobility Group, Terpene synthase, Isocitrate lyase, and NAD (P)-binding protein) showed to respond to the pathogen and also to Si, showing that this mineral may be involved in plant defense response not only by forming physical barriers, but also by modulating genes related to plant defense.

Key words Common bean. Anthracnose; *C. lindemuthianum*. Silicon. Gene expression.

5.1 INTRODUÇÃO

A ativação do mecanismo de defesa da planta ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor e culmina com a ativação das barreiras físicas e químicas envolvidas no processo.

Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) e a indução de compostos sinalizadores, como por exemplo, ácido salicílico e peróxido de hidrogênio (FERNANDES et al., 2009).

A resposta de defesa de plantas contra patógenos está associada com diversos eventos precoces e tardios, no que se diz respeito ao início do stress. Vários eventos fisiológicos, moleculares e celulares, como metabolismo oxidativo, mudanças no fluxo iônico e na síntese de fitoalexinas e de uma série de proteínas relacionadas à patogênese (PR), ocorrem durante a resposta da planta seguida da infecção pelo patógeno. Um grande número de respostas bioquímicas é rapidamente induzido. Além disso, plantas são capazes de aumentar a força da matriz extra-celular através da formação de cutina e deposição de calosidades. Estas respostas ativas e passivas levam tanto a defesas locais quanto sistêmicas contra uma série de ataques de patógenos (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998; OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002; SAROWAR et al., 2009; FALARA et al., 2011; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011).

Diferentes compostos inorgânicos ou orgânicos e diversas substâncias de origem biológica induzem resistência em plantas. Essas substâncias foram denominadas indutores, devido a sua capacidade de induzir resistência contra doenças nas plantas tratadas, sem apresentarem um efeito antimicrobiano direto sobre os agentes patogênicos. Os indutores podem ser compostos inorgânicos, como sais de fosfato (OROBER; SIEGRIST; BUCHENAUER, 2002); compostos orgânicos, como os ácidos graxos araquidônico, linoleico, linolênico e oleico (COQUOZ et al., 1995); quitosanas (BENHAMOU; THERIAULT, 1992); ácido salicílico, (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998), dentre outros.

Diversos estudos comprovam o efeito do silício na ativação de genes envolvidos na produção de compostos secundários do metabolismo, como os polifenóis e enzimas relacionadas com os mecanismos de defesa (FAUTEAUX et al., 2005), acúmulo de componentes antifúngicos como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (FAWE et al., 1998; RÉMUS-BOREL, MENZIES E BÉLANGER, 2005; FAUTEUX et al., 2006).

Além disso, a ação benéfica da aplicação de silício em plantas tem sido associada a outros efeitos como: aumento na capacidade fotossintética, plantas mais eretas, redução da transpiração, aumento da resistência mecânica das células, maior resistência das plantas a insetos e doenças; diminuição do efeito tóxico de certos metais pesados; maior tolerância ao estresse hídrico e salino e a radiação ultravioleta, dentre outros (LANA et al., 2003; SHEN et al., 2010; HASHEMI; ABDOLZADEH; SADEGHIPOUR, 2010).

Alguns genes que apresentaram expressão diferencial durante o experimento de validação da biblioteca SSH por RT-qPCR (Estudo 2) foram selecionados para o estudo de expressão temporal. Para isso, um novo experimento foi conduzido onde plantas da cultivar IAC-Harmonia foram submetidas aos seguintes tratamentos: i) regadas com solução nutritiva contendo silicato de potássio e inoculadas aos 15 dias após o transplante; ii) regadas com solução nutritiva não contendo silicato de potássio e inoculadas aos 15 dias após e iii) plantas regadas com solução nutritiva não contendo silicato e potássio e inoculadas com água, todos coletados durante os tempos de 0h; 6h; 48h e 72h após a inoculação. Para este experimento, 10 genes que se mostraram diferencialmente expressos no experimento de validação (Estudo 2) foram analisados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para entender como os genes se comportam durante a infecção e se o silicato de potássio absorvido pela planta é capaz de induzir a expressão de algum dos genes selecionados neste estudo, plantas da cultivar IAC-Harmonia foram submetidas aos seguintes tratamentos: i) regadas com solução nutritiva contendo silicato de potássio (75 ppm) e inoculadas aos 15 dias após o transplante; ii) regadas com solução nutritiva não contendo silicato de potássio e inoculadas aos 15 dias após o transplante e iii) plantas regadas com solução nutritiva não contendo silicato e potássio e não-inoculadas. A solução nutritiva usada neste experimento e a inoculação foi realizada da mesma forma descrita no Estudo 1. Os tempos definidos para as coletas neste estudo foram: 0 h; 6 h; 48 h e 72 h após a inoculação. Para cada tempo, 3 amostras biológicas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Cada material teve seu RNA extraído e quantificado conforme descrito no Estudo 2 e em seguida, fez-se o tratamento com *DNAseI* e validação por *RT* negativo com o

primer actina 21 (Figura 31). Para cada amostra biológica a extração foi feita em triplicata técnica.

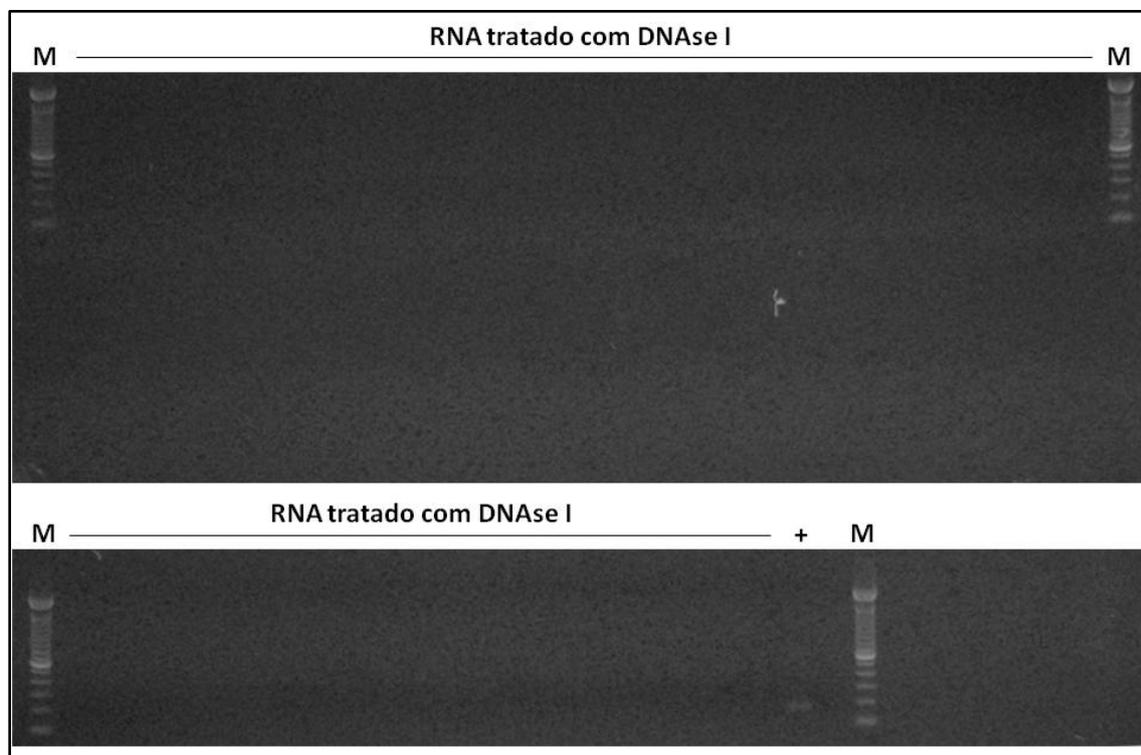


Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose 2% do teste de “RT negativo”. M, marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen); +, controle positivo, DNA genômico de feijoeiro; RNA tratado com DNaseI, RNA extraído das amostras de feijoeiro, tratados com DNaseI antes de ser submetida à transcrição reversa

5.2.1 Análise da expressão dos genes selecionados sob efeito do ataque do patógeno e suplementação com Si

Para avaliar a expressão de cada gene selecionado a partir das bibliotecas SSH, e de dois genes de referência (*Act 21* e *Insulina Degradante*) em quatro tempos de coleta (0h; 6h; 48h; e 72h) foram usadas duas amostras biológicas e três replicatas técnicas. Desta forma, fez-se necessário usar uma placa de 96 poços por tratamento, totalizando três placas por gene. Para este experimento, os genes foram selecionados com base nas respostas indicadas pela validação no Estudo 2 (Tabela 11), além de um outro gene selecionado com base nas literatura científica, por estar relacionado com o transporte de Si.

Tabela 11 - Relação de genes analisados no experimento de expressão gênica do Estudo 3

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	Biblioteca A / Reads	Biblioteca B / Reads	Expressão Relativa na Validação (Estudo 2)
2	<i>Basic Pathogenesis-related protein 1</i>	3	0	10,219
3	<i>Terpene synthase 2</i>	2	0	28,575
7	<i>Isocitrate lyase</i>	2	0	132,875
8	<i>Catalase 2</i>	7	1	0,872
9	<i>PHE Ammonia Lyase 1</i>	1	0	4,867
17	<i>High mobility group B2</i>	0	4	0,906
32	<i>2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)- dependent oxygenase superfamily protein</i>	0	3	3,362
35	<i>DNAJ heat shock family protein</i>	0	2	1,082
36	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	0	2	1,772
44	<i>Bifunctional inhibitor/Lipid-transfer protein</i>	0	3	26,739

O gene para *catalase* continuou selecionado para a avaliação final da expressão, mesmo não se mostrando diferencialmente expresso na validação (Estudo 2), pelo fato de ser bem representado no sequenciamento da biblioteca A.

Os genes *High mobility group B2* e *DNAJ heat shock family protein*, apesar de também não mostrarem diferença na expressão no processo de validação, foram mantidos na lista para a validação final. Isso se deve à possibilidade de que ele possa ser induzido em períodos anteriores a 72 h.

Além dos genes descritos na Tabela 11, também foi analisada a resposta do gene *Lsi2*, chamado de *P vulgaris Lsi2-like*, descrito na literatura por ser um transportador de Si descrito para arroz (MA; YAMAJI, 2006). A sequência do gene de arroz foi usada como base para busca da sequência de feijoeiro, depositada no banco de sequências *TIGR Gene Index*.

Foram selecionados então 11 genes, totalizando 39 placas de tempo real. A reação do tempo real foi a mesma descrita no item 4.2.22 (Estudo 2), assim como os cálculos de expressão conforme o item 4.2.23 (Estudo 2).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Variação da expressão gênica de genes responsivos ao estresse por antracnose e/ou suplemento de Si

A partir do banco de dados gerado pelo sequenciamento das bibliotecas subtrativas construídas neste projeto, dez genes foram selecionados para serem analisados em função de sua resposta à infecção da planta de feijoeiro pelo fungo *C. lindemuthianum*, utilizando RT-qPCR.

No caso da primeira biblioteca (A), as expressões relativas dos genes foram analisadas a partir da expressão nas amostras coletadas de plantas inoculadas com o patógeno normalizada pela expressão nos controles (plantas não-inoculadas). Neste caso, o tempo zero não foi analisado, uma vez que nesse tempo não há diferença entre as plantas da população controle e as plantas prestes a serem inoculadas.

Para a segunda biblioteca (B), a normalização foi feita entre a relação das amostras inoculadas e tratadas com silicato de potássio por 15 dias em relação das amostras inoculadas e não tratadas com silicato de potássio. Neste caso, o tempo zero de coleta, se refere as plantas recém inoculadas porém tratadas por duas semanas com 75ppm de silicato de potássio.

Basic Pathogenesis-Related Protein 1

O transcrito *Basic Pathogenesis-related Protein 1* foi rapidamente induzido pelo patógeno, mostrando um aumento de expressão de 2,6 vezes ($p = 0,014$) 6 h após a inoculação (Figura 32). Sua expressão continuou aumentando sendo que a maior indução foi observada em 48 h após a aplicação do inóculo (4,32 vezes, $p = 0,027$). Após 72 h, a sua expressão ainda é diferencial em relação ao controle, entretanto, em menor valor (2,64 vezes, $p = 0,028$). A expressão diferencial deste transcrito em todos os tempos já era esperada, uma vez que as

proteínas relacionadas à patogênese são induzidas por diferentes estímulos, principalmente os bióticos (EDREVRA, 2005; BORAD; SRIRAM, 2008). Em especial, a *Basic Pathogenesis-related Protein 1* que foi classificada como antifúngica (GORJANOVIĆ, 2009).

Resultados semelhantes também foram encontrados na interação feijoeiro e a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Dois genes relacionados à patogênese, nomeados de *PvPR1a* e *PvPR1b*, apresentaram acúmulo de transcritos mais evidenciados nos períodos de 72 h e 96 h após a inoculação (BORGES, 2012).

Através da superexpressão das PR-1 em tabaco, Alexander et al. (1993), observaram que a expressão constitutiva deste gene resultou na tolerância a infecção por *Peronospora tabacina* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. A exata natureza da tolerância promovida pela constitutiva expressão da PR-1 ainda é desconhecida. Acredita-se que a PR-1 possa promover um efeito anti-fúngico direto, o que resultaria no decréscimo da doença. Além disso, a PR-1 pode retardar o estabelecimento do patógeno ou pode ajudar no reconhecimento deste, levando a planta a ativar respostas adicionais de defesa, o que limitaria a infestação. A atividade anti-fúngica das PR-1 também foi descrita contra *Phytophthora infestans* em tomate e tabaco (NIDERMAN et al, 1995).

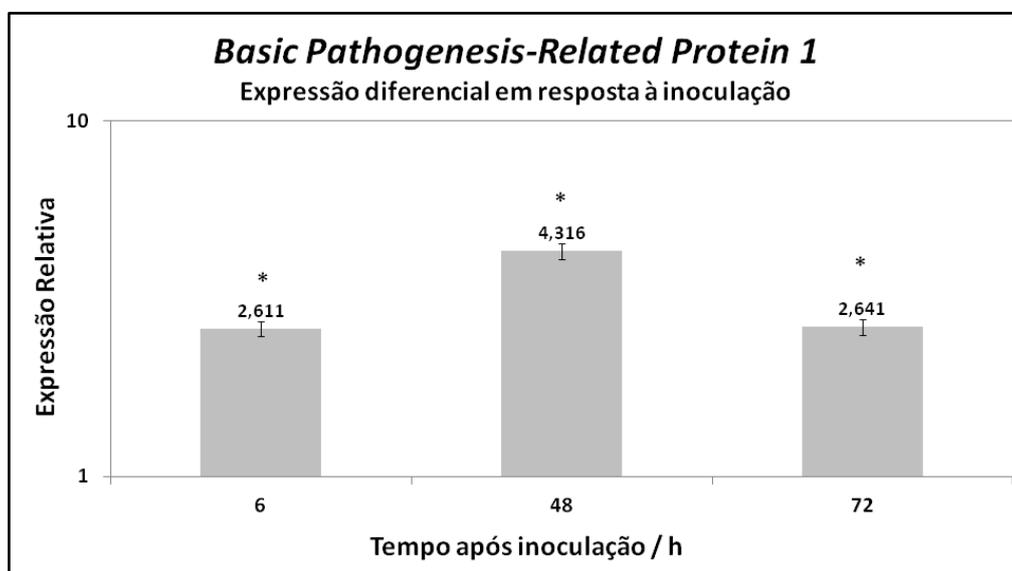


Figura 32 - Perfil temporal de expressão gênica de *Basic Pathogenesis-Related Protein 1* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Apesar desta biblioteca (B) também ter sido construída com inoculação da raça 65 de *C. lindemuthianum*, e de este gene responder ao ataque do patógeno, como visto na Figura 33, a adição de silício não foi capaz de modificar a sua expressão, ao contrário reprimindo a sua expressão em todos os tempos avaliados (Figura 33). Apesar disso, Rodrigues; Canales; Borrás-Hidalgo (2005) observaram que na interação de plantas de arroz infectadas por *Magnaporthe grisea*, houve uma acumulação diferencial deste gene nas plantas tratadas com silício.

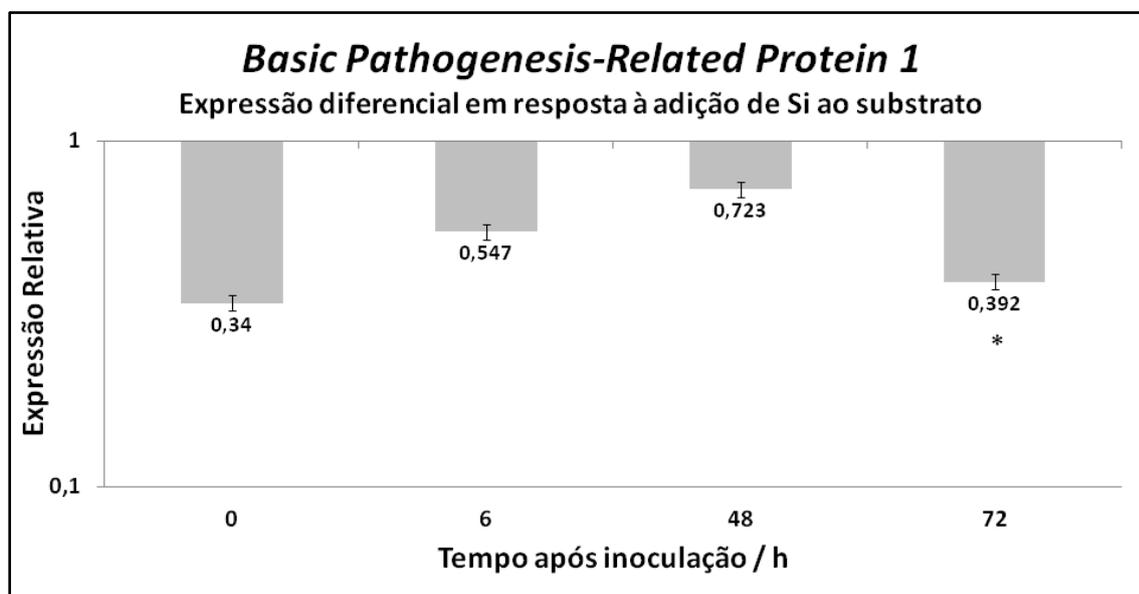


Figura 33 - Perfil temporal de expressão gênica de *Basic Pathogenesis-Related Protein 1* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Terpene synthase

A expressão do gene para *Terpene synthase* também foi rapidamente aumentada em resposta ao ataque do patógeno, 6 vezes ($p = 0,015$) após 6 h de inoculação (Figura 34). No tempo de 72 h após a inoculação, a expressão deste gene também foi maior 3,6 vezes ($p = 0,002$) em relação ao controle. Curiosamente, em 48 h não vemos uma diferença significativa entre a expressão de plantas tratadas e controle, possivelmente devido a algum mecanismo que deva reduzir a expressão e posteriormente aumentá-la.

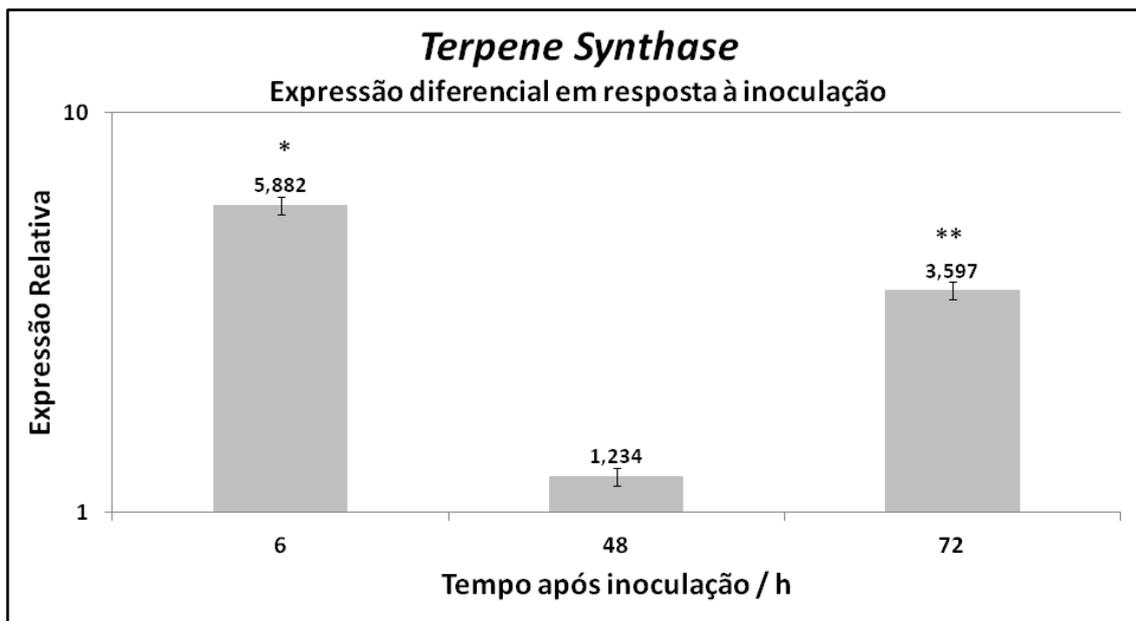


Figura 34 - Perfil temporal de expressão gênica de *Terpenase synthase* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$; **: diferenças significativas com $p < 0,01$)

Em relação à resposta a adição de Si ao substrato, o gene da *Terpenase synthase* teve sua expressão aumentada em 3.3 vezes ($p = 0,015$) no tempo de 72 h (Figura 35).

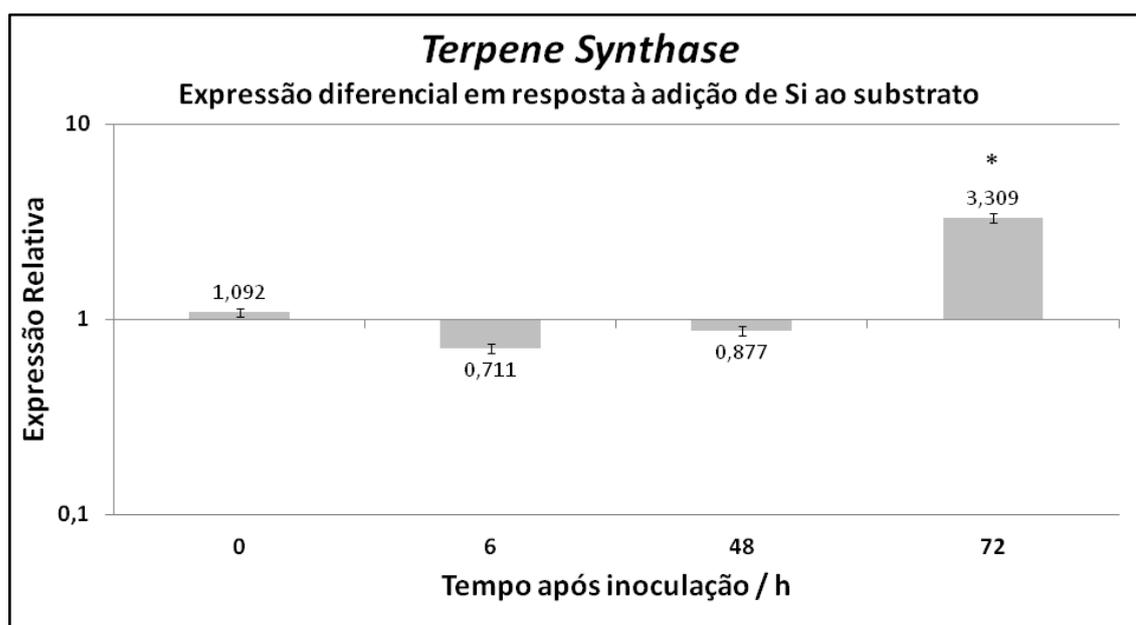


Figura 35 - Perfil temporal de expressão gênica de *Terpenase synthase*. (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

No presente trabalho vimos que a indução deste gene ocorre em resposta ao ataque do patógeno (6 h e 72 h após a inoculação) e também no tempo de 72 h após a inoculação quando as plantas cresceram com um suplemento de Si, indicando que este elemento pode ajudar na ativação da expressão deste gene. As funções biológicas da maioria dos terpenos em plantas estão ligadas não somente à biossíntese de hormônios, mas também à proteção contra radiação UV, estresses oxidativos, à resistência contra insetos e micro-organismos (COPOLOVICI et al., 2005; KEELING; BOHLMANN, 2006; THOLL, 2006). Desta forma, a alteração positiva deste gene no tratamento de plantas suplementadas por silício demonstra que este pode promover uma resposta tardia de defesa do feijoeiro contra o *C. lindemuthianum*.

Isocitrate lyase

O gene da *Isocitrate lyase* foi diferencialmente induzido 48 horas (Figura 36) após a infecção ($p = 0,01$). O gene foi reprimido nos tempos avaliados de 6 h e 72 h ($p = 0,003$) após a inoculação. Essa variação pode ser interpretada como modificações na membrana plasmática associada ao próprio processo de infecção (entrada da hifa).

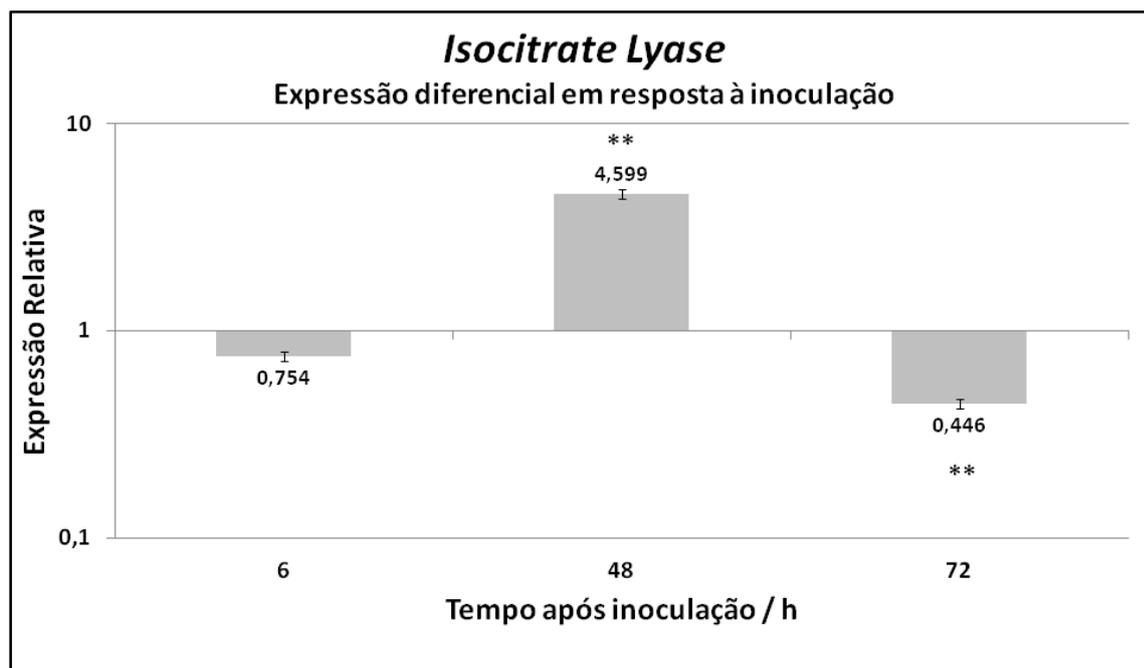


Figura 36 - Perfil temporal de expressão gênica de *Isocitrate lyase* (**: diferenças significativas com $p < 0,01$)

Para a adição de Si, uma expressão diferencial foi notada 48 h ($p = 0,046$) e 72h ($p = 0,015$) após a inoculação com o patógeno (Figura 37).

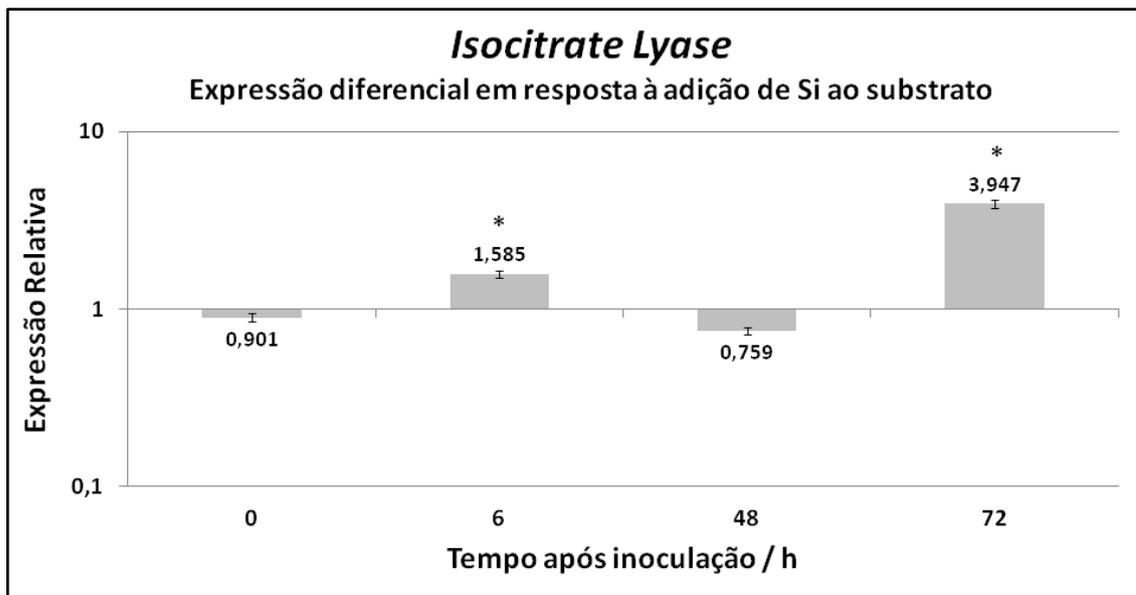


Figura 37 - Perfil temporal de expressão gênica de *Isocitrate Lyase* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Cinco enzimas participam do ciclo do glioxilato: Isocitrato liase; Malato sintase; Malato desidrogenase; Citrato sintase e Aconitase. Nesta via, a Isocitrato liase catalisa a clivagem de isocitrato para produzir succinato e glioxilato, enquanto que a Malato sintase catalisa a condensação de glioxilato em acetyl-CoA para produzir malato (BALERONI et al, 1997).

Apesar de verificarmos a presença deste gene nas bibliotecas subtrativas, e a análise de sua expressão mostrar que ele é induzido pelo inóculo do patógeno e também pelo suplemento de Si, não há ainda relatos na literatura científica relacionando a expressão deste gene em plantas como resposta ao ataque de patógenos. Uma melhor elucidação dos processos que possam envolver este gene em relação à defesa da planta ainda é necessária, e mais experimentos devem ser realizados para a formação de uma hipótese mais fundamentada do papel deste gene na resposta à infecção.

Catalase 2

O ácido salicílico (SA) desempenha papel central na ativação de certas respostas de defesa de plantas. Um modelo foi proposto onde AS se liga e inativa catalase, resultando em um aumento de H_2O_2 intracelular que age como um indutor dos genes de defesa do tipo PR-1. O H_2O_2 tem ainda uma atividade antibiótica contra a invasão dos patógenos atuando como intermediários na cascata de sinalização para a expressão de genes relacionados à defesa (DURNER; KLESSIG, 1995; SLESAK et al., 2007; ASHRY; MOHAMED, 2011).

Entretanto, apesar de participar do mecanismo de defesa da planta, o gene da *Catalase* se mostrou reprimido pelo ataque do patógeno no tempo de 72 h (Figura 38).

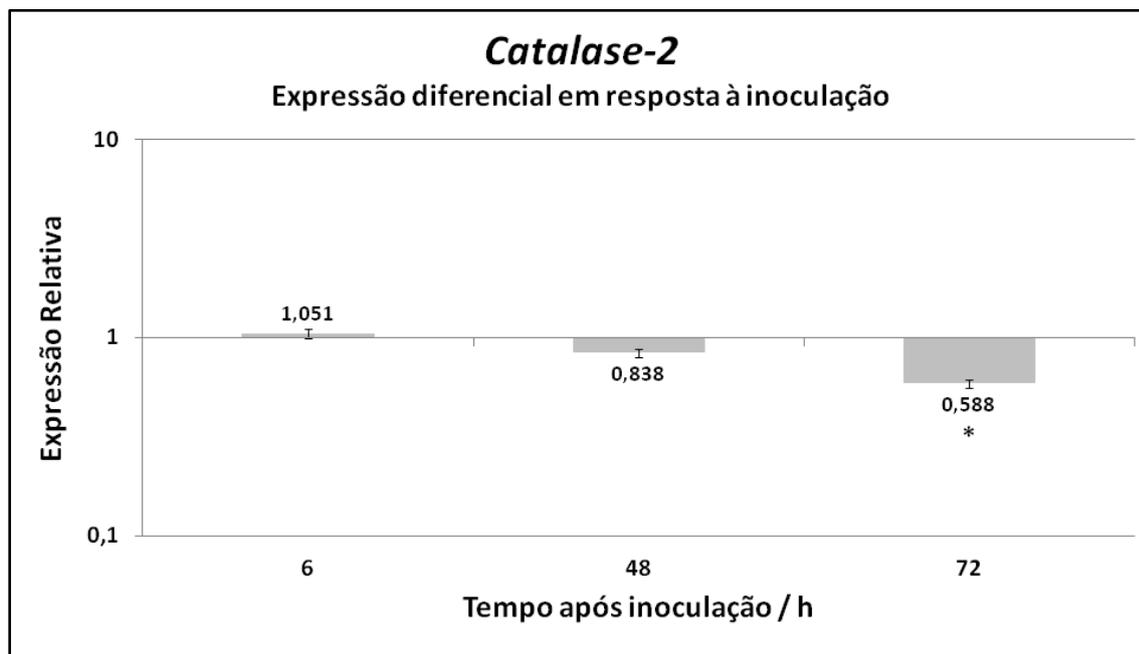


Figura 38 - Perfil temporal de expressão gênica de *Catalase-2* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Porém, quando a planta foi suplementada com Si, houve uma indução significativa de 1,3 vezes ($p = 0,018$) no tempo de 48 h após a inoculação (Figura 39), indicando que este gene é ativado pelo silício.

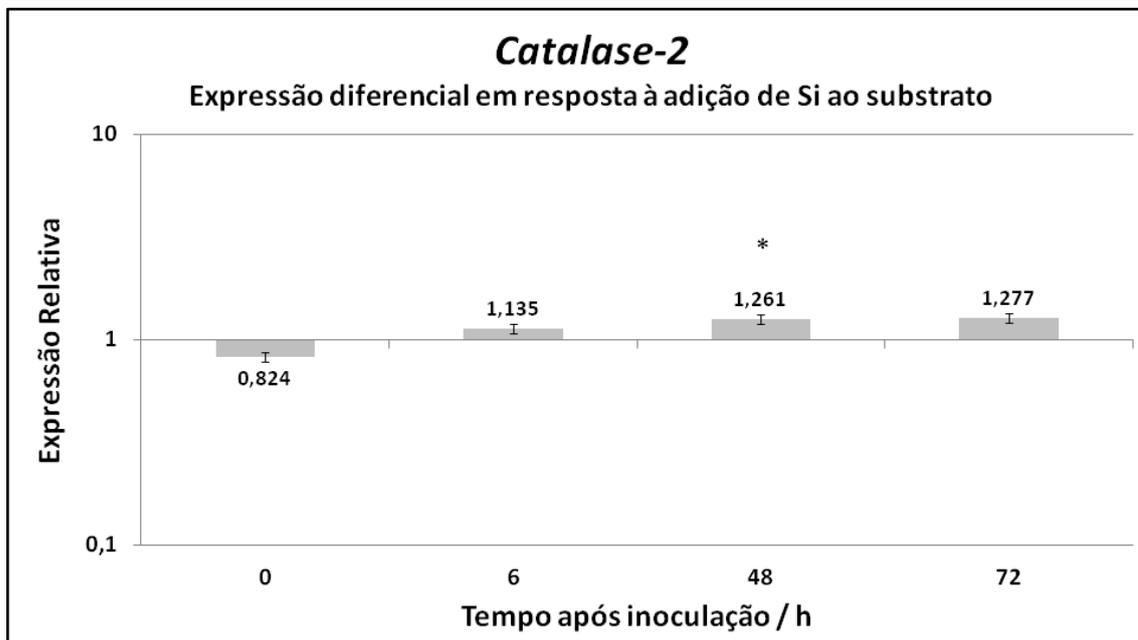


Figura 39 -Perfil temporal de expressão gênica de *Catalase-2* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

O efeito do silício na ativação da catalase e atenuação à diversos tipos de estresse já foi descrito em outras culturas. A adição do silício (3 mM Si de Na_2SiO_3) aumentou significativamente a atividade catalase em folhas de milho submetidas ao estresse salino. Esse aumento pode proteger os tecidos da planta do dano oxidativo causado por esse estresse. Estes resultados sugerem que este sistema de degradação forma a primeira linha de defesa protegendo dos possíveis danos do estresse salino em plantas (MOUSSA et al., 2006).

Em trigo submetido a déficit hídrico, a adição de silicato de sódio (2mM/kg de solo) foi capaz de induzir a atividade de diferentes enzimas dentre elas a catalase, demonstrando que o Si alivia o estresse hídrico através da prevenção contra os danos oxidativos da membrana e que isto pode estar associado com o ajuste osmótico da planta (AHMAD; HADDAD, 2011).

O efeito do silicato de sódio nas enzimas catalase e peroxidase foi avaliado em pepinos infectados *Phytophthora melonis*. Os resultados mostraram que as plantas tratadas com Si tiveram redução na severidade da doença em virtude do aumento da atividade enzimática tanto da catalase quanto da peroxidase (MOHAGHEGH et al., 2011).

Em cafeeiro, Martinati (2008) avaliou alguns processos bioquímicos envolvidos na resistência conferida pelo Si. Com base nos resultados, foi possível observar que as atividades das enzimas do estresse oxidativo Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), e Ascorbato peroxidase (APX) foram maiores em plantas tratadas, indicando que o Si parece estimular uma resposta mais rápida ao estresse oxidativo. O mesmo ocorreu com as enzimas relacionadas à defesa. A partir destes resultados, comprovou-se que o Si estimula uma resposta de defesa mais rápida em plantas de café suscetíveis à ferrugem quando inoculadas com o fungo patogênico.

A ativação deste gene pelo Si, observado neste trabalho corrobora com dados presentes na literatura científica, indicando que este pode possuir uma função na defesa da planta, sendo esta defesa aumentada pela maior disponibilidade de Si.

PHE Ammonia Lyase 1

A expressão do gene para *PHE Ammonia Lyase 1* ocorre de maneira crescente no decorrer do tempo após a infecção. Em feijoeiros inoculados com a raça 65 de *C. lindemuthianum*, este gene foi ativado após 48 h ($p = 0,002$) de infecção, tendo seu ápice em 72 h (7,2 vezes com $p = 0,024$) após a inoculação (Figura 40), mostrando assim a sua importância na interação de resposta do feijoeiro à raça 65 de *C. lindemuthianum*. A alta ativação deste gene pelo patógeno já era esperado, uma vez que a *PHE ammonia lyase* catalisa a conversão da L-fenilalanina em Trans-cinamato, que são processo inicial de uma gama de vias metabólicas de fenilpropanoides em plantas. As funções dos fenilpropanoides na defesa da planta vão desde a formação de barreiras físicas (lignina) e químicas contra a infecção até a produção de moléculas envolvidas na sinalização local e sistêmica para ativação de genes de defesa (ISAAC, 1991; FERRER et al., 2008; PURWAR; GUPTA; KUMAR, 2012).

Borges (2011) também identificou a expressão diferencial através de RT-qPCR desta enzima em feijoeiro infectado pela raça 73 de *C. lindemuthianum*, entretanto, o pico de expressão se deu no tempo de 24 h, revelando níveis de expressão duas vezes maiores em relação ao controle, decaindo ao passar do tempo. Esta resposta temporal diferenciada encontrada pode ser resultado da diferença genotípica entre as duas amostras. A cultivar usada

neste estudo (IAC-Harmonia) é tolerante a antracnose e a usada por Borges (2011) a SEL 1308, é altamente resistente a essa doença.

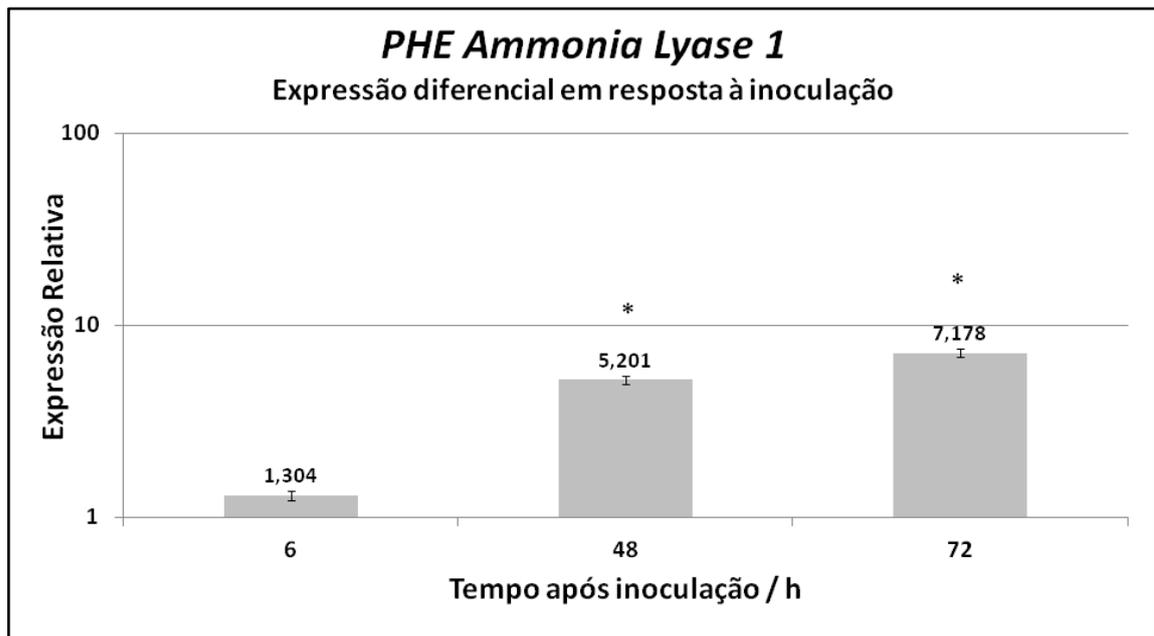


Figura 40- Perfil temporal de expressão gênica de *PHE Ammonia Lyase 1* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Apesar de sua importância na resposta de defesa da planta, o suplemento de Si, reduziu a expressão do gene nos tempos 6 h, 48 h e 72 h após a inoculação (Figura 41). Entretanto, um estudo feito em arroz, por exemplo, correlaciona queda na incidência de *Magnaporthe grisea* a maiores atividades da Fenilalanina amônia liase em plantas suplementadas com o mineral em relação as não tratadas (CAI et al., 2008).

Por se tratar de uma enzima chave na via de defesa das plantas, novos testes, poderiam ser realizados com diferentes dosagens de silicato de potássio ou até mesmo com diferentes fontes do mineral para tentar elucidar esta questão.

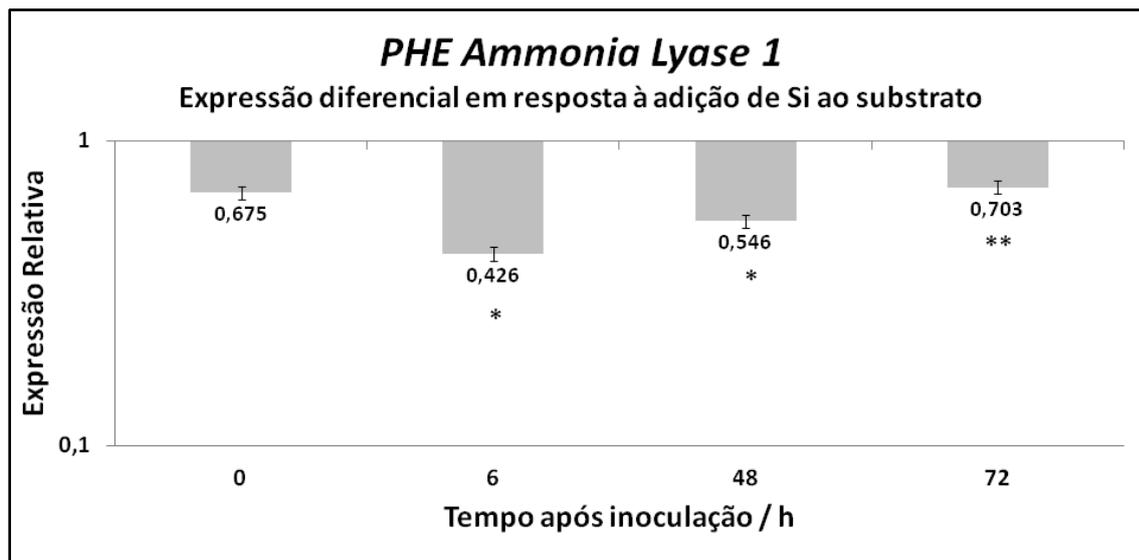


Figura 41 - Perfil temporal de expressão gênica de *PHE Ammonia Lyase* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$; **: diferenças significativas com $p < 0,01$)

High Mobility Group B2 Protein

Para o gene da *High Mobility Group B2 Protein*, um acréscimo significativo 1,5 vezes ($p = 0,032$) foi observado no tempo de 48 h após a inoculação (Figura 42).

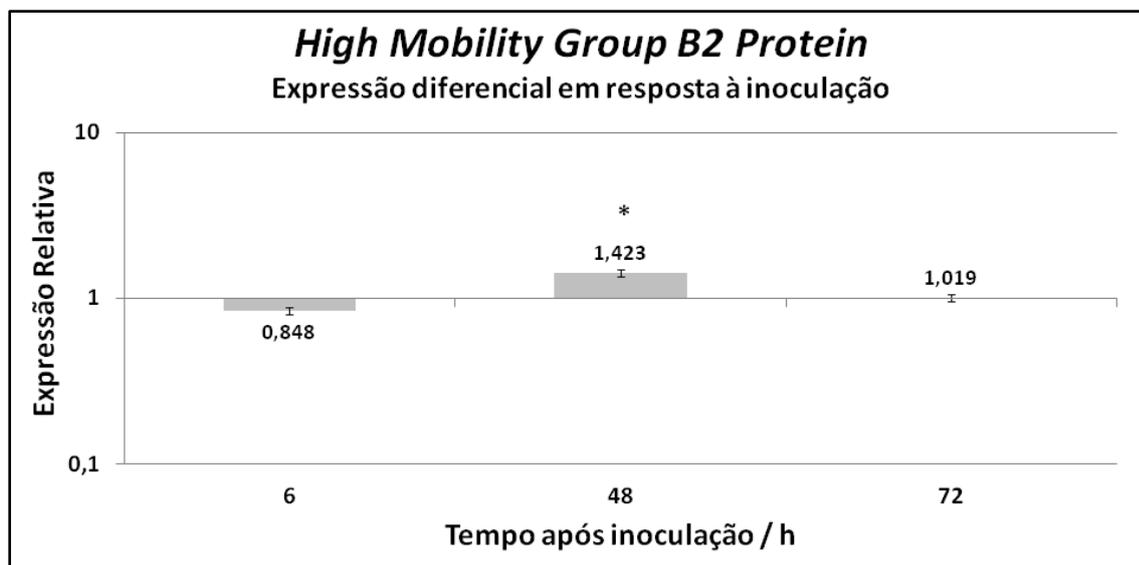


Figura 42 - Perfil temporal de expressão gênica de *High Mobility Group B2 Protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Este gene também teve sua expressão regulada positivamente, porém precocemente as 6 h ($p = 0,045$) e negativamente em 48 h ($p = 0,031$) após a inoculação, nas plantas suplementadas com Si (figura 43).

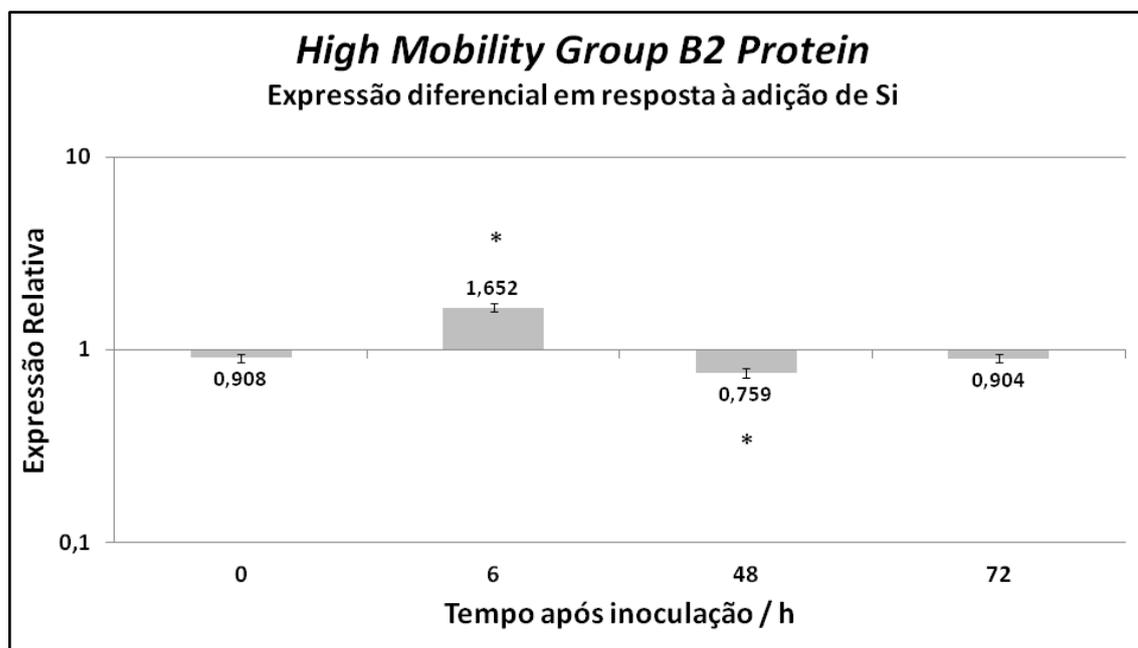


Figura 43 - Perfil temporal de expressão gênica de *High Mobility Group B2 Protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

No presente estudo, o gene anotado como sendo da família das *High Mobility Group B2 Proteins* teve sua expressão significativamente alterada nos dois tratamentos, sendo que sem suplemento de Si o auge de sua expressão se deu 48 h após a inoculação, e quando o suplemento de Si foi adicionado ao substrato, a indução foi adiantada para 6 h após a inoculação.

Proteínas do grupo das *High mobility group B (HMGB)* participam de vários processos celulares como replicação, transcrição e montagem do nucleossomo. Através da caracterização de plantas de *Arabidopsis* transgênicas, superexpressando este gene sobre estresse salino, hídrico e frio, foi possível observar que existe uma grande variação nos níveis de transcritos expostos aos diferentes estresses. Segundo Kwak et al., (2007) essa diferença nos níveis de transcrição fortemente indicam que as *HMGB* podem participar da adaptação das plantas às mudanças ambientais. Desta forma, os resultados aqui encontrados indicam que a presença de Si induz uma resposta mais rápida da planta à resposta ao estresse imposto.

2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein

O gene *2-oxoglutarate(2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein* teve sua expressão elevada em 48 h ($p = 0,018$) após a inoculação, quase 2 vezes mais em relação ao controle (Figura 44). Este resultado de ativação da expressão corrobora com dados da literatura que demonstram que as enzimas dependente de 2OG fazem parte da biossíntese de diversos metabólitos, incluindo flavonóides, giberelinas e etileno (WILMOUTH, et al, 2002). A resposta regulada pelo etileno é determinada pela contenção e redução da colonização de tecidos infectados pelo patógeno, resultando na atenuação dos sintomas manifestados pela doença (FEYS; PARKER, 2000) além de mediar diferentes tipos de resistência induzida (van LOON; GERAATS; LINTHORST, 2006).

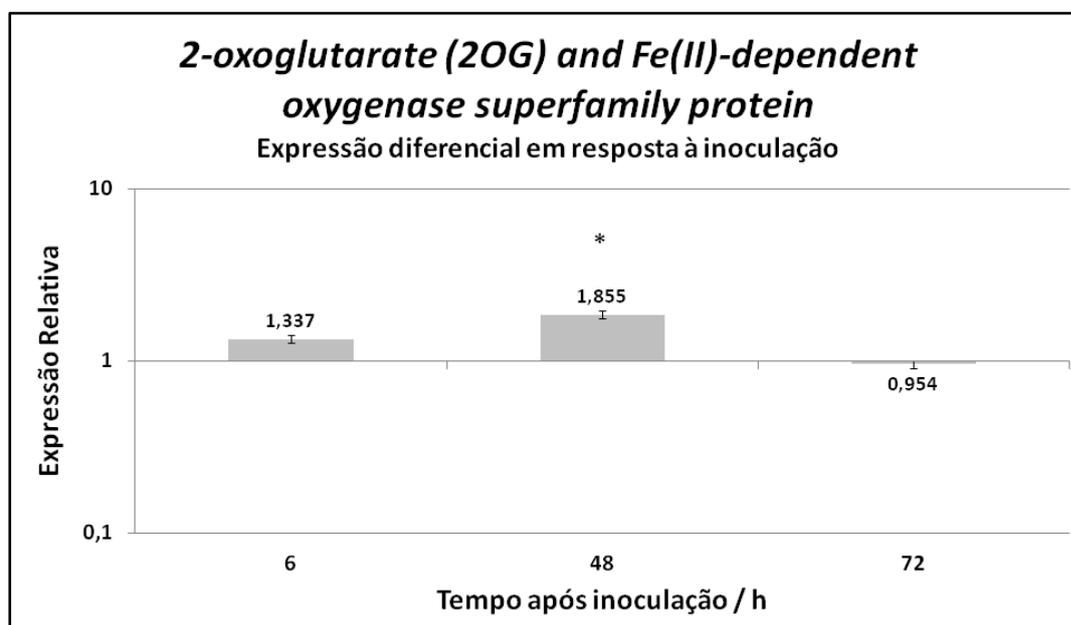


Figura 44 - Perfil temporal de expressão gênica de *2-oxoglutarate(2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Apesar disso, este gene não sofreu alteração significativa, em nenhum dos tempos avaliados no estudo com suplemento de Si (Figura 45).

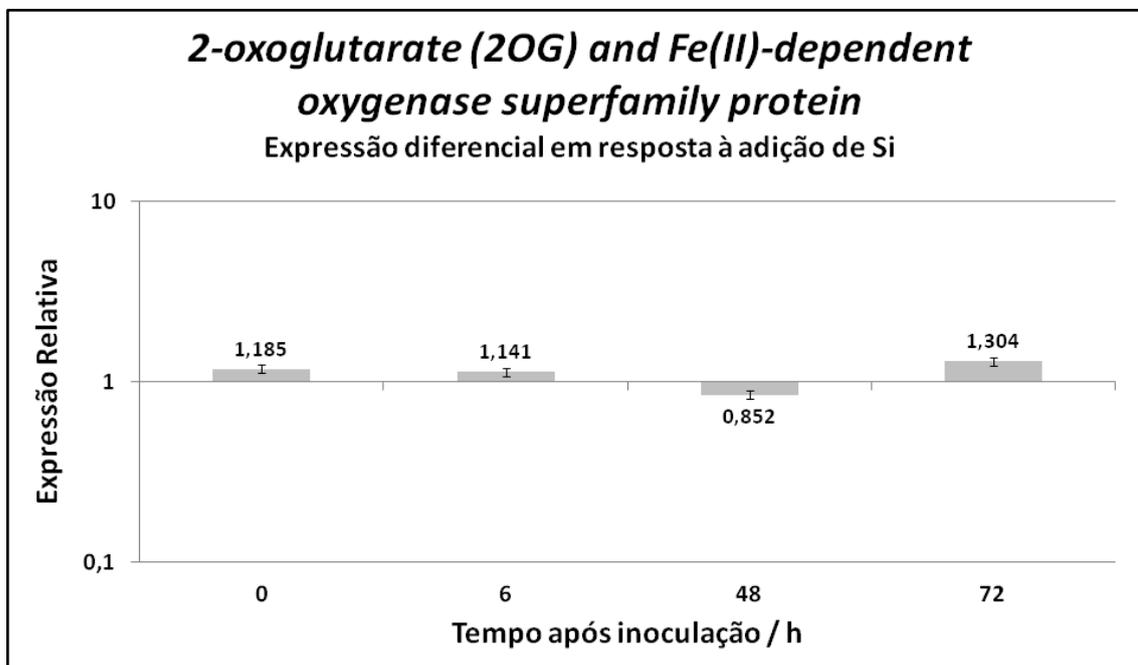


Figura 45 - Perfil temporal de expressão gênica de *2-oxoglutarate(2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein*

DNAJ heat shock family protein

A expressão do gene *DNAJ heat shock family protein* não se alterou significativamente em nenhum dos tempos avaliados após a inoculação (Figura 46). Este resultado não era esperado uma vez que a DNAJ é uma chaperona que está associada ao processo de formação de proteínas, inibindo que peptídios formem agregados, e assim prevenindo que durante a resposta intensa ao estresse, que deve ser rápida, as novas proteínas acabem sendo mal-formadas. As *HSP* são expressas principalmente quando a célula é exposta a situações de extrema temperatura ou estresse, ajudando assim a manter a situação de homeostase de proteínas vitais durante situações extremas (RODRÍGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005; BECKER; CRAIG, 1994). Em *Arabidopsis*, essa classe de proteínas

mostrou responder a estímulos bióticos, como o ataque por vírus, bactérias e fungos (ZHAO; JONES, 2012) e em feijoeiro para estresse hídrico (RECCHIA, 2011).

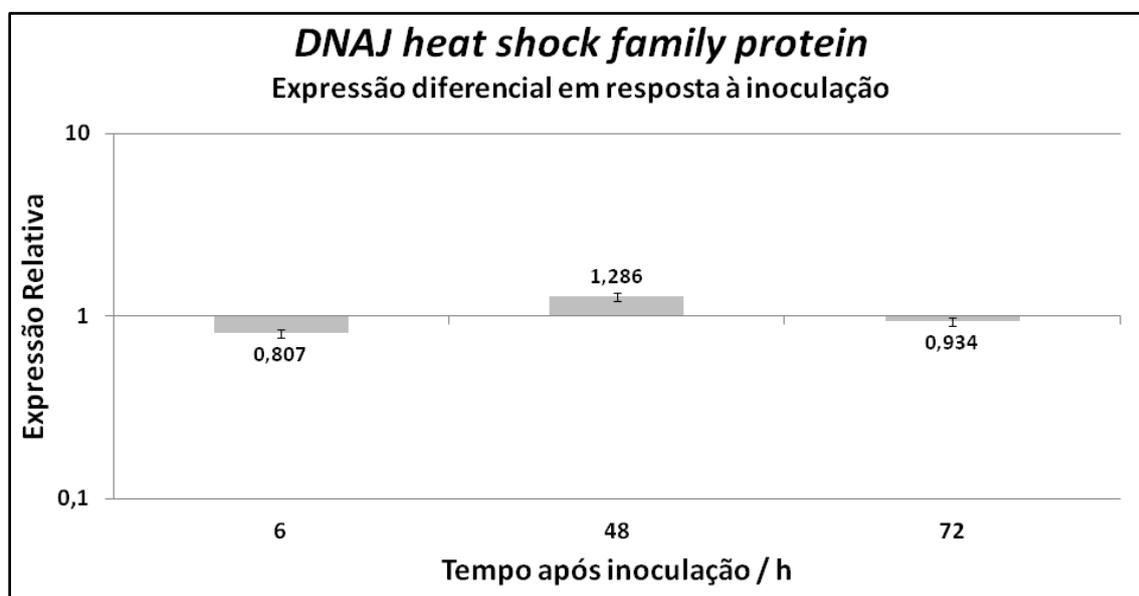


Figura 46 - Perfil temporal de expressão gênica de *DNAJ Heat Shock Protein*

Porém, quando as plantas foram suplementadas com Si, o gene *DNAJ heat shock protein* teve sua expressão aumentada significativamente nos tempos 0 h ($p = 0,02$) e 48 h ($p = 0$) (Figura 47). No presente trabalho, esta *Heat Shock Protein (HSP)* foi induzida apenas nas amostras inoculadas quando suplementadas com Si levando a crer que plantas suplementadas com este mineral respondem melhor aos estímulos de ataque de patógenos.

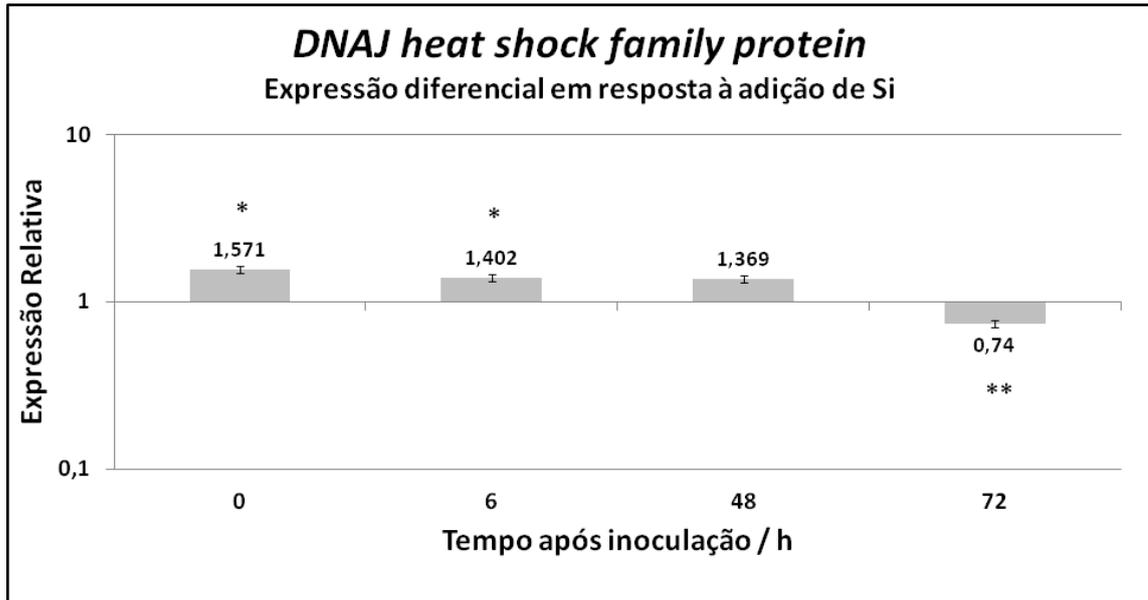


Figura 47- Perfil temporal de expressão gênica de *DNAJ Heat Shock Protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$; **: diferenças significativas com $p < 0,01$)

NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein

O gene *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein* teve a expressão alterada no tempo de 48 h após a inoculação ($p = 0,003$) (Figura 48). Plantas podem sofrer danos oxidativos devido à acumulação de espécies reativas de oxigênio em altos níveis de estresses abióticos. Deste modo, elas tiveram que desenvolver um número de sistemas de defesa anti-oxidante para combater o estresse oxidativo. Um destes sistemas envolve a geração de um agente redutor chave, *NAD(PH)*, com funções tanto em atividades metabólicas quanto em mecanismos de defesa em resposta a uma série de estresses ambientais, como irradiação UV, salinidade e seca, além de transdução de sinal e sistemas de defesa anti-oxidativos (CHAI et al., 2006; SHI; LI; WANG, 2009; HASHIDA; TAKAHASHI; UCHIMIYA, 2009).

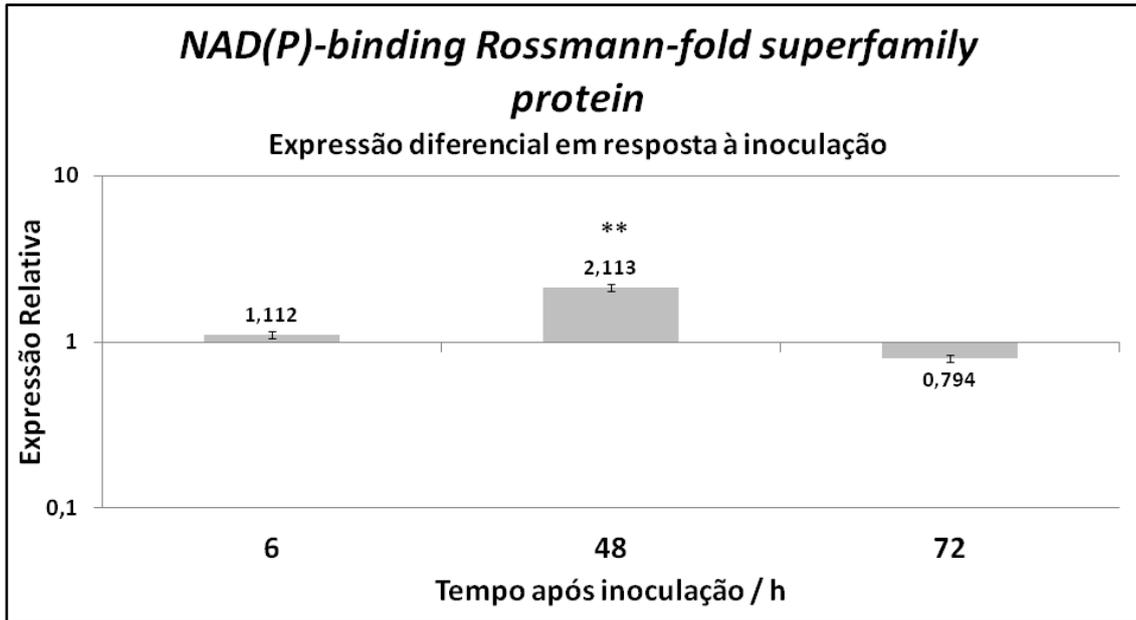


Figura 48 - Perfil temporal de expressão gênica de *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein* (**: diferenças significativas com $p < 0,01$)

Esta resposta positiva de expressão também foi encontrada nas plantas inoculadas na presença de silício, porém no tempo de 72 h ($p = 0,023$) (Figura 49).

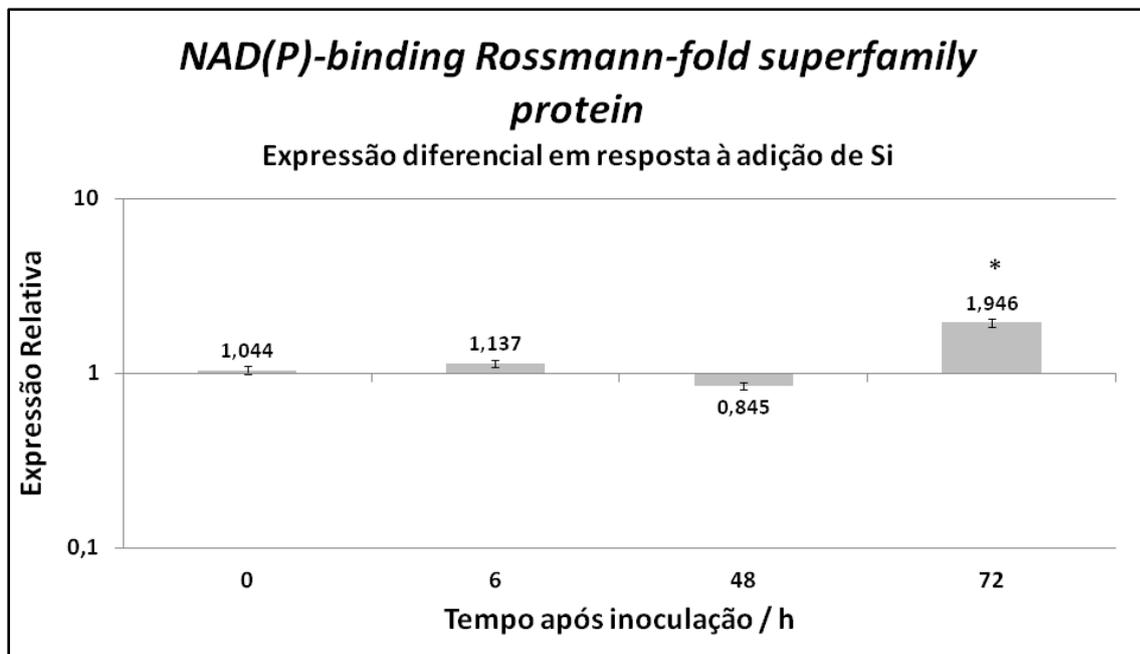


Figura 49 - Perfil temporal de expressão gênica de *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Uma patente relatando métodos para gerar ou aumentar resistência a patógenos através da redução da expressão de NAD(PH) oxidase foi depositada (US8067668B2). A maior expressão do gene está associado a ativação do mecanismo de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo assim, podemos concluir que a inoculação com o *C. lindemuthianum* e a adição do Si no substrato aumentam a síntese deste gene, que participa de algum modo nas respostas da planta a diferentes tipos de estresse.

Lipid-transfer protein

As Lipid-transfer protein (LTPs) são moduladas por condições de estresses e possuem diversas funções, incluindo biossíntese de cutina, formação de cera epicuticular, defesa de plantas, adaptação a mudanças ambientais e até mesmo como sinalizadores celulares (SAROWAR et al., 2009; ARONDEL et al., 2000; BLEIN et al., 2002). Apesar disso, para este gene a expressão foi significativamente reprimida em todos os tempos avaliados (Figura 50).

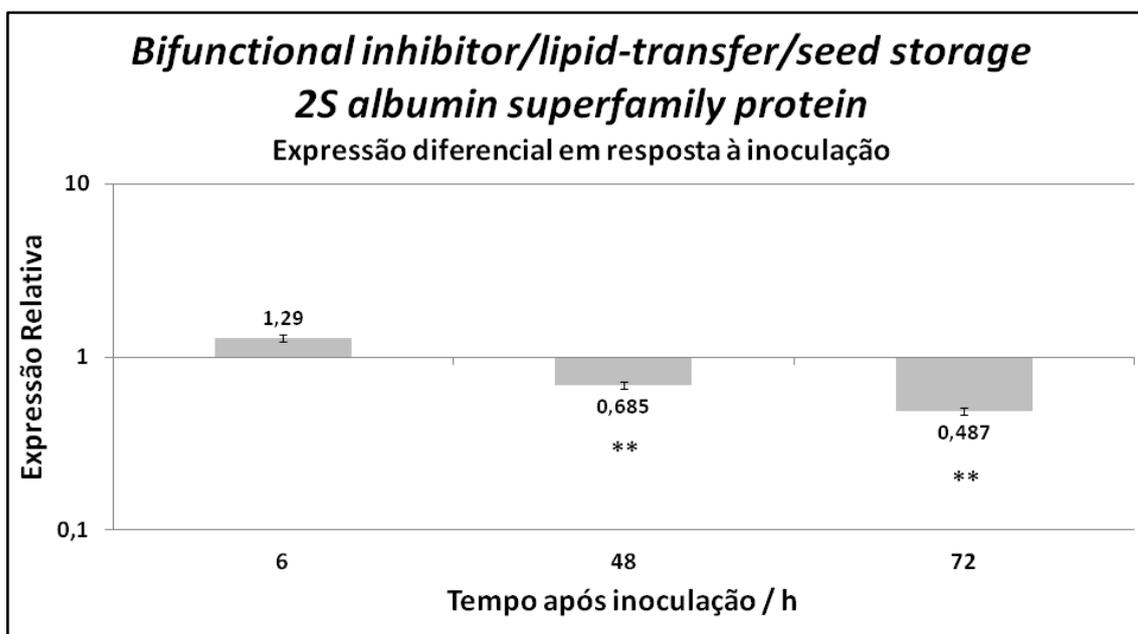


Figura 50 - Perfil temporal de expressão gênica de *Lipid Transfer Protein* (**: diferenças significativas com $p < 0,01$)

Porém quando o feijoeiro foi suplementado com o silício, este gene foi induzido nos tempos de 48 h ($p = 0,023$) e 72 h ($p = 0,011$) após a inoculação (Figura 51). Usando Northern blot (CAMERON; TEECE; SMART, 2006), foi observado um aumento de expressão de cerca de seis vezes *LTPs* de tabaco submetidos ao déficit hídrico. Os autores relacionaram este aumento a síntese e deposição de cutículas nas folhas. Este resultado leva a crer que este gene pode estar promovendo uma maior resposta de resistência da planta através da biossíntese de cutina e de cera epicuticular uma vez que as *LTPs* são induzidas pela infecção por patógenos (KADER, 1996).

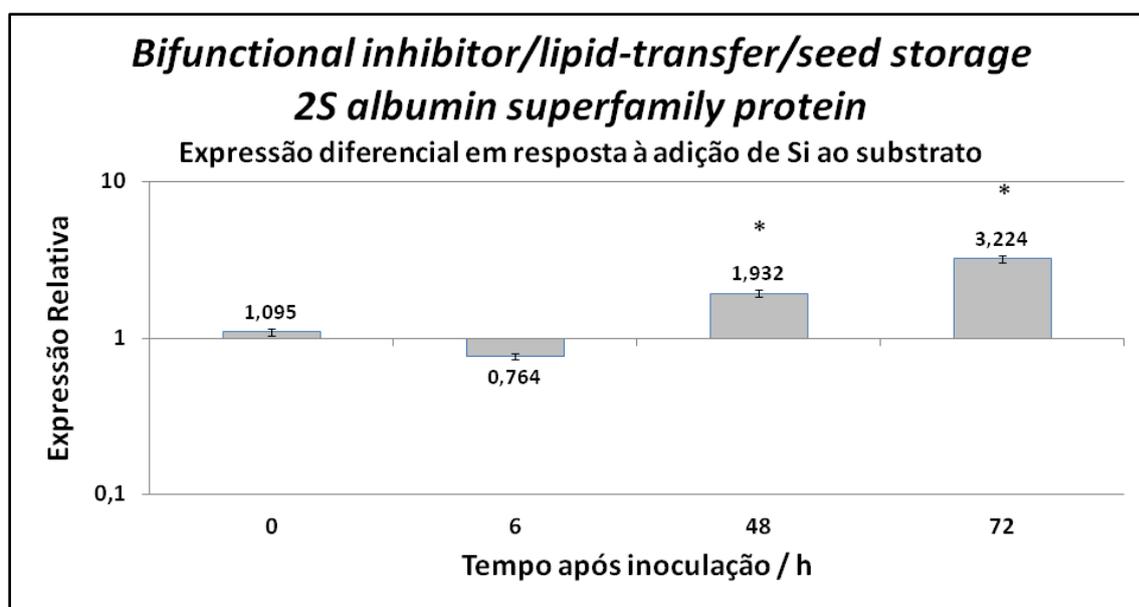


Figura 51 - Perfil temporal de expressão gênica de *Lipid Transfer Protein* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

P. vulgaris Lsi2-like

O transportador de Si *Lsi1* é responsável por transportar o silício da solução externa para as células corticais da raiz. Já o *Lsi2* é responsável por levar o silício para o xilema. (MA et al., 2007a, 2007b). Ele foi descrito em arroz por Ma; Yamagi (2006). A cooperação entre

Lsi1 e *Lsi2* leva a uma alta e eficiente absorção de silício e consequentemente a sua acumulação em arroz (MA; YAMAJI, 2006; MA et al., 2007a, 2007b; YAMAJI; MA, 2011).

Por ser um dos responsáveis pelo transporte de Si para dentro da planta, uma busca deste gene, tendo como base a sua sequência em arroz, foi feita no *NCBI* para feijoeiro. O primer para avaliação deste gene foi então desenhado a partir de um *EST* de feijoeiro com homologia com a sequência de arroz. Este gene não teve sua expressão alterada positivamente em função da inoculação com o patógeno em nenhum dos tempos avaliados (Figura 52).

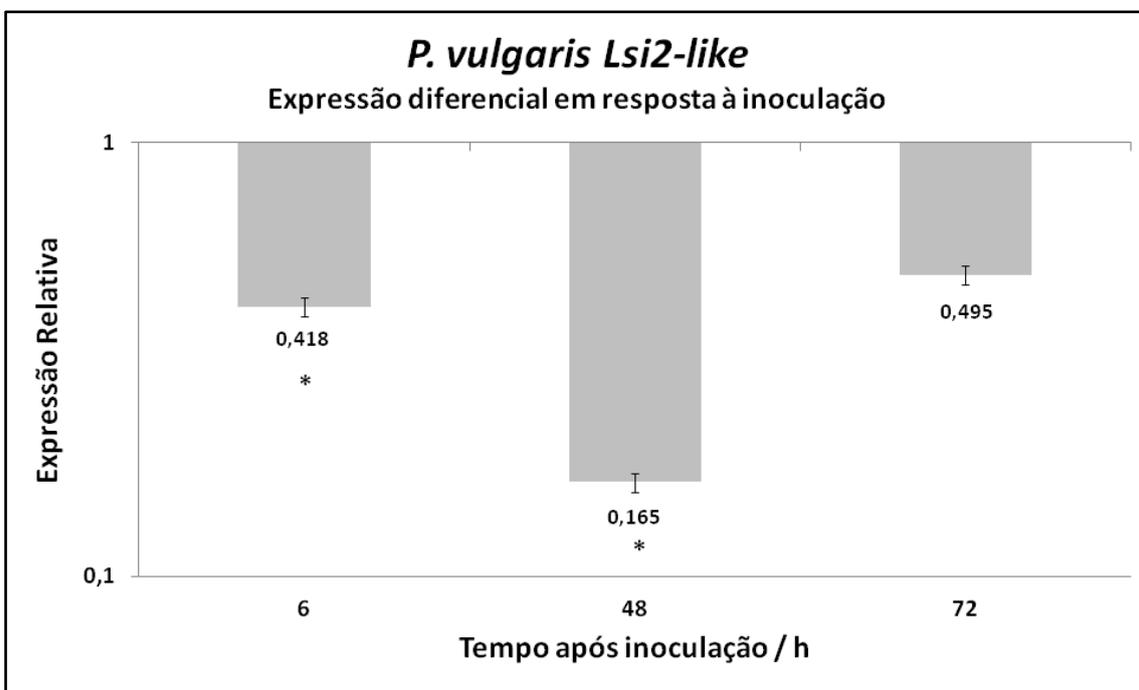


Figura 52 - Perfil temporal de expressão gênica de *P. vulgaris Lsi2-like* (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

A alteração de sua expressão em amostras suplementadas com Si foi notada nos tempos 0 ($p = 0,029$) e 48h ($p = 0,015$) após a inoculação (Figura 53). O resultado encontrado condiz com o esperado, onde houve apenas expressão diferencial nos tratamentos com Si. Experimentos adicionais são necessários para uma melhor caracterização deste *putative* gene, e para que sua atividade de transportador de silício seja comprovada.

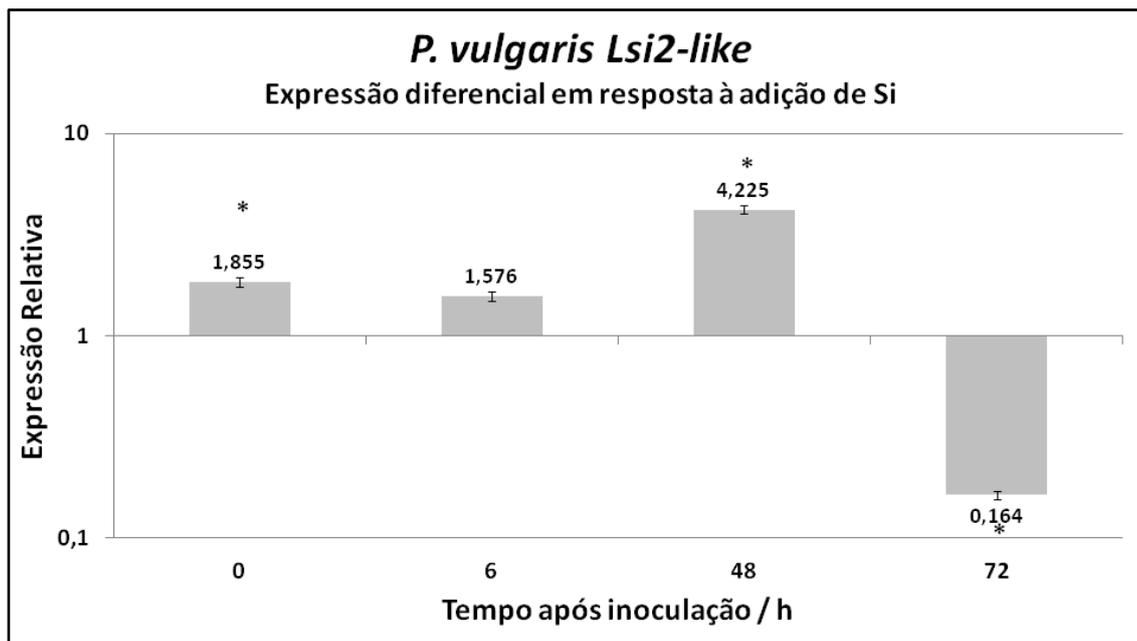


Figura 53 - Perfil temporal de expressão gênica de *P. vulgaris* Lsi2-like (*: diferenças significativas com $p < 0,05$)

Um resumo com o comportamento para cada um dos genes durante o tempo pode ser visto na Figura 54. Nota-se que dos 11 genes escolhidos para esta análise, sete (*Basic pathogenesis-related1*; *Terpeno sintase*; *Isocitrato liase*; *Fenilalanina amônia liase*; *Hight mobility group B2*; *2oxoglutarate (2OG) and FE(II)-dependent oxygenase superfamily protein* e *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*) tiveram sua expressão regulada positivamente em relação ao controle, em pelo menos um dos tempos avaliados. O destaque fica com o gene *Basic pathogenesis-related protein 1*, que foi diferencialmente expresso em todos os tempos avaliados. Destaque também para o gene de maior expressão que foi o que codifica *PHE ammonia lyase* (mais do que sete vezes em relação ao controle).

Genes avaliados	Tempo após inoculação		
	6 h	48 h	72 h
<i>Basic PR Protein 1</i>	2,6 *	4,3 *	2,6 *
<i>Terpene Synthase</i>	5,8 *	1,2	3,6 *
<i>Isocitrate Lyase</i>	0,7	4,6 **	0,4 *
<i>Catalase-2</i>	1,05	0,84	0,59 *
<i>PHE Ammonia Lyase 1</i>	1,3	5,2 *	7,2 *
<i>High Mobility Group B2 Protein</i>	0,85	1,4 *	1,02
<i>P. vulgaris LSI2-like</i>	0,42 *	0,16 *	0,49
<i>2OG</i>	1,3	1,86 *	0,95
<i>DNAJ heat shock</i>	0,8	1,3	0,9
<i>NAD(P)-binding</i>	1,1	2,1 **	0,8
<i>Llipid transfer</i>	1,3	0,69 **	0,49 **

Figura 54 - Quadro resumindo a expressão dos genes analisados para o contraste inoculado *versus* não-inoculado em escala temporal. Em verde são mostrados os genes ativados (diferença estatística encontrada). Em amarelo estão os genes que não diferiram em relação ao controle. Em vermelho, os genes reprimidos (diferença estatística encontrada)

Um resumo com o comportamento para cada um dos genes em plantas inoculadas e suplementadas com Si pode ser visto na Figura 55. Nota-se que dos 11 genes escolhidos para esta análise, oito deles (*Terpene synthase*; *Isocitrate lyase*; *Catalase 2*; *High mobility group B2*; *2-oxoglutarate (2OG) and FE(II)-dependent oxygenase superfamily protein*; *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*; *Bifunctional Inhibitor/Lipid-transfer protein* e *P. vulgaris Lsi2-like*), tiveram sua expressão regulada positivamente em relação ao controle, em pelo menos um dos tempos avaliados. O destaque fica com o gene *2-oxoglutarate (2OG) and FE(II)-dependent oxygenase superfamily protein* que foi diferencialmente expresso em três dentre os quatro tempos avaliados, sendo também o gene de maior expressão (4,2 vezes mais expresso que o controle).

Genes avaliados	Tempo após inoculação		
	6 h	48 h	72 h
<i>Basic PR Protein 1</i>	0,56	0,7	0,4 *
<i>Terpene Synthase</i>	0,7	0,9	3,3 *
<i>Isocitrate Lyase</i>	1,6 *	0,7	3,9 *
<i>Catalase-2</i>	1,1	1,3 *	1,3
<i>PHE Ammonia Lyase 1</i>	0,43 *	0,55 *	0,7 **
<i>High Mobility Group B2 Protein</i>	1,65 *	0,76 *	0,9
<i>P. vulgaris LSI2-like</i>	1,6 *	4,2 *	0,16 *
<i>2OG</i>	1,1	0,8	1,3
<i>DNAJ heat shock</i>	1,4 *	1,37	0,74 **
<i>NAD(P)-binding</i>	1,1	0,85	1,95 *
<i>Lipid transfer</i>	0,76	1,9 *	3,2 *

Figura 55 - Quadro resumindo a expressão dos genes analisados para o contraste inoculado com silício *versus* inoculado sem silício em escala temporal. Em verde são mostrados os genes ativados (diferença estatística encontrada). Em amarelo estão os genes que não diferiram em relação ao controle. Em vermelho, os genes reprimidos (diferença estatística encontrada)

5.4 CONCLUSÕES

- *PHE ammonia lyase*, *Basic PR1e* e *2-OG* se mostraram induzidos apenas pelo ataque do patógeno;
- *High Mobility group*, *Terpene synthase*, *Isocitrate lyase*, e *NAD(P)-binding protein* foram diferencialmente induzidos em resposta ao ataque pelo patógeno e também induzido pelo suplemento de Si;
- *Lsi2*, *DNAJ*, *Lipid Transfer Protein* e *Catalase* se mostraram induzidos em plantas com maiores concentrações de Si disponível para absorção;
- Dos 11 genes que tiveram sua expressão estudada em relação à inoculação com ou sem suplemento de Si, nove mostraram algum tipo de resposta.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.T.; HADDAD, R. Study of silicom effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Prague, v. 47, n. 1, p. 17-27, 2011.
- ALEXANDER, D.; GOODMAN, R.M.; GUT-RELLA, M.; GLASCOCK, C.; WEYMAN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOX, D.; AHL-GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E.; RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogen-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 90, p. 7327-7331, 1993.
- ARONDEL, V.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; KADER, J.C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 157, p. 1-12, 2000.
- ASHRY, N.A.; MOHAMED, H.I. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. **World Journal of Agricultural Sciences**, Dubai, v. 7, n. 1, p. 78-85, 2011.
- BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; COSTA, S.C.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrate lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrate in cotyledons of canola. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 189-192, 1997.
- BECKER, J.; CRAIG, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 219, p. 11-13, 1994.
- BENHAMOU, N.; THERIAULT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 33-52, 1992.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 13-21, 1998.
- BLEIN, J.P.; COUTOS-THÉVENOT, P.; MARION, D.; PONCHET, M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defence mechanisms. **TRENDS in Plant Science**, Amsterdam, v. 7, n. 7, p. 293-296, 2002.
- BORAD, V.; SRIRAM, S. Pathogenesis-related proteins for the plant protection. **Asian Journal of Experimental Sciences**, Jaipur, v. 22, n. 3, p. 189-196, 2008.
- BORGES, A.; TSAI, S.M.; CALDAS, D.G.G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, p. 827-838, 2012.

CAI, K.; GAO, D.; LUO, S.; ZENG, R.; YANG, J.; ZHU, X. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 134, p. 324-333, 2008.

CAMERON, K.D.; TEECE, M.A.; SMART, L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of Lipid Transfer Protein in response to periodic wounding events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 176-183, 2006.

CHAI, M.F.; WEI, P.C.; CHEN, Q.J.; AN, R.; CHEN, J.; YANG, S.; WANG, X.C. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 47, 665-674, 2006.

COPOLOVICI, L.O.; FILELLA, I.; LLUSIA, J.; NIINEMETS, U.; PENUELAS, J. The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 485-496, 2005.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 85, n. 10, 1995.

DURNER, J.; KLESSIG, D. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington v. 92, p. 11312-11316, 1995.

EDEVRA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, p. 105-124, 2005.

FALARA, V.; AKHTAR, T.A.; NGUYEN, T.T.H.; SPYROPOULOU, E.A.; BLEEKER, P.M.; SCHAUVINHOLD, I.; MATSUBA, Y.; BONINI, M.E.; SCHILMILLER, A.L.; LAST, R.L.; SCHUURINK, R.C.; PICHERSKY, E. The tomato terpene synthase gene family. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, p. 770-789, 2011.

FAUTEUX, F.; CHAIN, F.; BELZILE, F.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. The protective role of silicon in the Arabidopsis-powdery mildew pathosystem. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 46, p. 17554-17559, 2006.

FAUTEUX, F.; RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 1-6, 2005.

FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 396-401, 1998.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JÚNIOR, J.R.; da SILVA, D.S.G.; REIS, N.D.; ANTUNES JÚNIOR, H. Mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Documentos/EMBRAPA**, Rondônia, n. 133, p. 1-14, 2009.

FERRER, J.L.; AUSTIN, M.B.; STEWART JR, C.; NOEL, J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008.

FEYS, B.J.; PARKER, J.E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 449-455, 2000.

GORJANOVIĆ, S. A Review: Biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 115, n. 4, p. 334-360, 2009.

HASHEMI, A.; ABDOLZADEH, A.; SADEGHIPOUR, H.R. Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grow canola, *Brassica napus* L., plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 56, p. 244-253, 2010.

HASHIDA, S.; TAKAHASHI, H.; UCHIMIYA, H. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, p. 819-824, 2009.

ISAAC, S. Fungal-plant interaction. London, Chapman & Hall Press, 1991, 418 p.

KADER, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 47, p. 627-654, 1996

KEELING, C.I.; BOHLMANN, J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defense of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**, v. 170, p. 657-675, 2006.

KWAK, K.J.; KIM, J.Y.; KIM, Y.O.; KANG, H. Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing high mobility group B protein under high salinity, drought or cold stress. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 2, 221-231, 2007.

LANA, R.M.Q.; KORNDÖRFER, G.H.; ZANÃO JÚNIOR, L.A.; SILVA, A.F.; LANA, A.M.Q. Efeito do silicato de cálcio sobre a produtividade e acumulação de silício no tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n.2, p. 15-20, 2003.

MA, J.F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **TRENDS in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 8, p. 688-691, 2006.

MA, J.F.; YAMAJI, N.; MITAMI, N.; TAMAI, K.; KONISHI, S.; FUJIWARA, T.; KATSUHARA, M.; YANO, M. An efflux transporter of silicon in Rice. **Nature**, London, v. 448, p. 209-212, 2007a.

MA, J.F.; YAMAJI, N.; TAMAI, K.; MITAMI, N. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 919–924, 2007b.

MARTINATI, J.C. **Aspectos bioquímicos em plantas de cafeeiro tratadas com silício**. 2008. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 535-540, 1998.

MAZID, M.; KHAN, T.A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MOHAGHEGH, P.; KHOSHGOFTARMANESH, A.H.; SHIRVANI, M.; SHARIFNABI, B.; NILI, N. Effect of silícion nutrition on oxidative stress induced by *Phytophthora melonis* infection in cucumber. **Plant Disease**, Saint Paul v. 95, v, 4, p. 455-460, 2011.

MOUSSA, H.R. Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 8, n. 2, p. 293-297, 2006.

NIDERMAN, T.; GENETET, I.; BRUYERE, T.; GESS, R.; STINTZI, A.; LEGRAND, M.; FRITIG, B.; MÖSINGER, E. Pathogenesis-Related PR-1 proteins are antifungal. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 17-27, 1995.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 345-353, 2002.

PURWAR, S.; GUPTA, S.G.; KUMAR, A. Enzymes of phenilpropaoid metabolism involved in strengthening the structural barrier for providing genotype and stage dependent resistance to Karnal Bunt in wheat. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 3, p. 261-267, 2012.

RECCHIA, G.H. **Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvidos na resistência ao estresse hídrico**. 2011. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 148, 2011.

RÉMUS-BOREL, W.; MENZIES, J.G.; BÉLANGER, R.R. Silicon induces antifungal compounds in powdery mildew-infected wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 108-115, 2005.

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

SAROVAR, S.; KIM, Y.J.; KIM, K.D.; HWANG, B.K.; OK, S.H.; SHIN, J.S. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens

and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 419-427, 2009.

SHEN, X.; ZHOU, Y.; DUAN, L.; LI, Z.; EGRINYA ENEJI, A.; LI, J. Silicon effect on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 1248-1252, 2010.

SHI, F.; LI, Y.; WANG, X. Molecular properties, functions and potential applications of NAD kinases. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai v. 41, n. 5, p. 352-361, 2009.

SLESIAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxidase in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. **Acta Biochimicaotanica Polonica**, Warszawa, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2007.

THOLL, D. Terpene synthase and regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 9, p. 1-8, 2006.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **TRENDS in plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 4, p. 184-191, 2006.

WILMOUTH, R.C.; TURNBUL, J.J.; WELFORD, W.D.; CLIFTON, I.J.; PRESCOTT, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Structure**, London, v. 10, p. 93-103, 2002.

YAMAJI, N.; MA, J.F. Further characterization of a Rice silicon efflux transporter, Lsi2. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 259-264, 2011.

ZAO, L.; JONES, W.A. Expression of heat shock proteins genes in insect stress response. **Invertebrates Survival Journal**, Modena, v. 9, p. 93-101, 2012.

ANEXOS

ANEXO A - Sequências usadas para o desenho dos Primers usados nos experimento de RT-qPCR.

Basic pathogenesis-related protein 1

>Contig12691 feijao.fasta.cap.ace from 30 to 693

GGGAAAACCAAACATGGGTTTGCCATGATCCCAATGCTTTCTTTGGTAGCGATCCTTTTAGCCACATCAACACTGTCTCAA
 TTTGTGATGCACAAAACCTACCCCAAGACTTCCTCAACGCTCACAACACTGCGCGTTCCCAAGTTGGGGTAGGACCAATTAGA
 TGGGATGCAACAGTAGCTTCTTTTGACAAAACCTACGTGAACAAAACCTAAAGGGTAACTGCAAGATGGTGCACCTCTGGGGTCC
 TTATGGGGAGAACCTTGCATGGAGCAGTGGTGACCTCACAGCCACATCTGCTGTGAACCTGTGGGTGGGAGAGAAGCCACACT
 ATGATTACAACCTCCAACAGCTGCGTTGGTGGAGAGTGCAGACACTACACTCAGGTGGTGTGGCGCAACTCGGTGCGTCTTGGG
 TGTGCTAAAAGTGCCTGCAACGACGGTCGTAGCACCATCATCAGCTGCAACTATGATCCACCAGGGAACCTATATTGGTCAGAG
 GCCTTTGATATTAGTCCCTTCCAAGTACCTTTGAGCTTTAATAAACGTGTGGATCATAATATGTGAAGCCACGTGTGGAA
 TAAAATAAATGTATTGCTGCCAGTTCTGCATATATTTGTTTATATGCAGAATCGCGTGCCAGCTTCAGCTGTATCACTTATGC

Terpene synthase 2

>Contig10740 feijao.fasta.cap.ace from 241 to 821

GTACGAGTTCTGATGAATGGAGCAAACATGGAACCACTAACTTACTTGAATTGATTGATGATATTGAACGGTTGGGACTGTC
 CTTCAAGTTTGAGGAGGATATAAACAAAGCTCTTCTCAAATTTGTTTCAATTGAAAACCTCGAAGACCAAACCGGAAAAAGTC
 TGCATGAAACCGCTCTTCTTTTGGAAATTCAGACGACATGGCTTTGATGTCTCCCAAGATATTTTTATGAGTTCAAAGAT
 GAAGAAGGAAAATTCAAGGCTGAAATAAGCAATGATGTAGAAGGAATGTTAAGTTTATACGAAGCATCATACTTGAGCTTCGA
 AGGAGAAAGTGTGGGAGGCAAATGCATTTTCAAGAACACATCTGATGAATTTAATGAAAGAAGGATTAATGGATGCGAAAA
 TGGCAGAAAAAGTTAGTCATGTATTGGAGGGCTTCTTATCATCGAAGCTGTTTCAGACTAATGGCAAGAGAGTGTATTAAC
 AAATATGATAAGATAGAACCGCATAATCTCTTATTGTTAGAAGCTGCAAAGCTGAATTTCAACATACAACAGTCATCATATCA

Isocitrate lyase

>Contig12662 feijao.fasta.cap.ace from 1 to 678

TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACAACCTCTCTCCATCCTTCAACTGGGATGCTTCTGGCATGAGTGATGAGCAAATGAGAGA
 CTTCAATCCCAAGATTGCAAAGTTGGGGTATGTGTGGCAGTTCATCACAGTTGGAGGTTTGCATTCTAATGCACTCATCACTT
 CAACATTTTCAAGAGACTTTGCCAACAGGGGCATGCTGGCTTATGTGGAGAGGATTGAGAGAGAGGAGGAAACAATGGGGTT
 GACACACTTGCCACCCAGAAATGGGCTGGTGCTAACTACTATGACAGATACCTCAAGACTGTTCAAGGAGGTGTGGCTTCAAC
 TGCTGCAATGGGAAAAGGCAAGTCATACACTATTATTACACACTAACACACATCATGCATCAATAAGATCATTGACTTTTGT
 GATAATTGTTTTGAAAATTATACCTAGAAAGATTTCTAATTAATTGAGATAAAAAGATGTTTATACTCACAGAATGTCAAAC
 CAACTTTTTTTTCCCTTTGATGTTTTTGTAGGAGTAACTGAAGATCAGTTTANAGAATCATGGACTANGCCAGGAGCTGTTG
 ACATTGATAGAGGCAGTATTGTGGTTGCTGAGGCCAGAATGTGAAAGTTCTACTTCTGCTTAACTATGCTGCTGAAGCTGGAA
 TTTCGGCCAGCTTC

Catalase 2

>Contig4583 feijao.fasta.cap.ace from 1339 to 2798

CTCCTGTTTATAACAACAACCTCTCTTTAACTGTTGGAGCTAGAGGTCCAATTCTCCTGGAGGATTATCATCTTGTGGAAAAG
 CTTGCAAACCTTTGACAGGGAACGGATCCCAGAACGTGTTGTCCATGCCAGGGGAGCTAGTGCAAAGGTTTCTTTGAGGTCAC
 ACATGACGTTTCTCACCTGACATGTGCAGATTTCTTTCGAGCTCCTGGAGTTCAGACACCAGTAATTGTCCGTTTTTCAACTG
 TCATCCATGAGCGTGGTAGCCCTGAAACTTTGAGGGACCCTCGAGGTTTTGCTGTGAAATTTTACACCAGAGAGGGTAACTTC
 GATCTTGTGGAAAACAACCTTCCCGTCTTCTTTGTACGCGATGGCATGAAGTTTCCAGATATGGTCCATGCTCTTAAACCCAA
 CCCTAAAAACCACATCCAGGAGAATTGGAGGATCCTTGACTTCTTCTCTCACTTTCCGAAAGCCTTCACATGTCTCCTTTT
 TATTTGATGATTTGGGTGTTCCACAAGATTACAGGCATATGGATGGTTTTGGAGTTAACACATATACCTTGATCAGCAAGGCT
 GGGAAAGCAGTGTATGTGAAATTTCACTGGAAGACCGTGAGTGGTGTGAAGTGTCTATTGGAGGAAGAGGCCATTAAGGTGGG
 AGGAGCCAACCATAGCCATGCTACTCAAGACCTTCATGATTCCATTGCTGCTGGTAACTATCCTGAGTGGAACTGTTTCATTC
 AGACAATAGATCCTGCACACGAAGACAAATTTGACTTTGACCCCTTGTATGTAACCAAACTTGCCCGAGGACATTATACCC
 TTGCAGCCTGTTGGTTCGCTTGGTCTGAATAAGAACATAGATAACTTCTTCGCCGAGAATGAGCAACTTGCATTTTGCCTGC
 CATAGTGGTTCTGGTGTATATTACTCAGATGATAAGATGCTTCAAACCAGGATATTCTCTTATGCCGATTCACAGAGGCACA
 GGCTTGGACCAAACCTATCTGCAACTTCCCTGCCAATGCTCCCAAGTGTGCTCACCACAACAATCACCATGAAGGTTTCATGAAT
 TTCATCCACAGGGATGAGGAGGTCAATTACTTCCCTTCGAGGTATGATTCTGTTCGTCATGCAGAAAAGTTTCCCCATACCTCC
 TGCTATCTGCTCTGGAAGGCGTGAAAAGTGTGAATTGAGAAGGAGAACAACCTCAAGCAGGCTGGAGAGAGATTCCGATCTT
 GGGCACCTGACAGGCAAGATAGATTTATCCGCCGATGGGTTGATGCTTTATCTGACCCACGTGCACCCATGAAATCCGCAGC
 GTCTGGATATCATACTGGTCTCAGGCTGACCGTCTCTTTGGCCAAAAGATAGCATCTCATCTGAACATGAGGCCAAACATTTA
 ATGTTGTTGCCAACCCAGAAATGATTGCGAGAGTTGCGGTCGTGTAAAG

PHE ammonia lyase 1

>Contig9255 feijao.fasta.cap.ace from 755 to 908

CATACCCACTGATGCAAAAACCTTAGGCAAGTGCTGTAGACCATGCCTTGATAAATGCAGAGAATGAGAAGGATGTCAACACA
 TCAATCTTTCAAAAAGATTGCAACCTTTGAGGAGGAGTTGAAGACCATCTTGCCAAAGGAGGTTGAAAGTAC

High mobility group B2

>Contig9337 feijao.fasta.cap.ace from 346 to 793

GACAACAAAGCCGTTTCGGCCGTTGGAAAGGCTGCTGGAGCAAAATGGAAAACAATGTCTGATGCTGATAAAGCACCGTTTGT
 GGTAAAGTCTGAGAAACGAAAGGTGGAGTATGAGAAAAGCATGAGAGCCTATAACAAGAAGCAGGCGGAAGGTCCTACTGCTG
 GAGATGAAGAAGAATCTGAGAAGTCAGTATCTGAGGTGAATGATGAGGATGATGATGAGGAGGGCAGTGGCGAGGAGGAGGAT
 GATGATTAGAGAGTGGACTGATAACAATTTATGTAGTTTTTGTGATTTGGATCATCTTTTGTAGGTGGTCTGGTCATTTCCCT
 GATGATAAACAAACATGTTTCTTTCTTCCAGAAAAATATTTCTCTGCTCCCTCCGTAAAATTGTTTTGTCTGTCCAAAACGTG
 AATAGTTGAAAGATGGGAGATCTTTATTTGTAC

2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein

>Contig12775 feijao.fasta.cap.ace from 69 to 350

CAAACACCAGAGAACAGGCCAAAGCTTTGTATCATTGAAGAAGAGGGAATCCCTGTGATAGACCTCTCCCCTTTATTCTGCAG
CTCTTCTCCATCACAGACCCTTCCTTTGAAGATCTTGTGAGGAAAATAGGCAGTGCATGCAGAGAGTGGGGTCTTCCAAG
TGATCAACCATGGAGCCCCAGTTGAGAGGAGGAAGAAGATGGAAGCAGAAGCAAGGAAGTTCTTACCAGAGGAAGGAGCAG
AAGAATGAGGTGAGAAGGGATGATGTGCATGTT

DNAJ heat shock family protein

>Contig12845 feijao.fasta.cap.ace from 19 to 466

GTACATGGGGTGATTTCTCTAATACTTACCTACCCTTTTGCAGCCACTTACACAAAAGTCCTTTACAAAAGCATACAAAATT
TCTTCCCCTCACAAAGCTCTGATTTTCAGCAGAACTCGGTTTTTGTTCGTGTTGTGTTGAAATGGGTGCTGGTGACTIONTACA
AGATACTGAAGGTGAAACGTGATGCCACTAATGAAGAGGTGAAGAGGGCTTATAGGAGTTTGGCCATGAAATGGCACCCGGAT
AAAAACCTTGAAGACCCGCTTAGGAAGGAAGAGTTTGAAGCCAAGTTCAAGCAGGTTGCTGAGGCCATGATGTGCTCATTGA
CCCCAAGAAGCGCCAGATCTATGATCTATACGGTCACTATCCCCTTAACCTCAACGCTTACGCAAAGAACATGGTAATGGGA
TTATGAAGGAAGCAGGGGTGGTTGAAAGCAGCT

NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein

>Contig10506 feijao.fasta.cap.ace from 565 to 908

GTACAATGTGCCTAAGATGCAACGAGATACCCAACCAGGATTATTGAGAGTGAAGGATGGATCAAAGAACTTATGGATTTGG
GTTTGCAAATCACTCCAATTGAGGAGATTATTAAGGATTCTGTAGAGGATTTGAAGAAAAAAGATTCCCTCCATAATTGCTG
CTGCAATATGAGTCCTTATGGCACATATGTTTGGTGCAAATTCCTGTTGTTGTTAATCTGTTATATTTGTTGGTGTGGTTGTT
GTTATGTTTGCATTGTTCTAAAACAAGTGACGAGAGACATCTTTGTA AACATTTTCTACCTAATTTTAGTTCATGGGTGGAT
CTCTATTTCTGT

Lipid-transfer protein

>Contig2103 feijao.fasta.cap.ace from 199 to 773

GGAAGTGCCCAAAGGACACATTAAGCTAGGGGCTTGTGCAGACATTCTAGGACTTGTTAATATTGTTGTTGGCTCACCTGTC
TCCAGCAAGTGTTGTGCATTGCTTTCGGGTTTGGCTGATCTAGAGGCTGCACCTTGCCTCTGCACTGCCATCAAGGCCAATGT
GCTTGAATCAACTTGAATGTGCCTATCACACTCAGTGTGCTACTCAGTGCTTGCCAAAAACAGTTCCCTTCTGGCTTCCAAT
GTCCATAGAATTCATCATGCTAGGTTTCATCTCATCACCTTGTGTCCTCAATTTGTTGCTTTTAGAGTTCTTCCTTTTGTG
CAATGTGTGCATGTTTCATTTAATAATTTGGCAAACACATGTTTGTCCAAATCAGTAACCTTTGCTCTTTTCTAGTAAATT
TGTTATTTATGTAAGTTTATTTTTGGGGTATGTTAAAGGTAGAGGGTTTGATTTGCTAAGCCAAATCTTAAAGACCAATA
TGCAGAATTTATTTAATTTAGAATCAAGTGTGATTATCAATTTATATATAAGTTCAGCACTGTCTCTTAATTTCC

Lsi1

>TC41418 TC16116

TC28053ATTCATAAGGATGAAGAGGATCCAATTTTCAGAAGTTGCAGAAGAGGAGATTATGTCCCATCAGTTTTCTCCAGCTA
 TAATGACTCATTGTGGACCCTTTAATTCTGAAGAATGCAATGACAGTTCAGAACCAACTAATAATCTTCAGAACTCTTCTCAA
 GTTCACGTTATGACAGACCAACAGTGCCAAGTTAAGGGAAGTTCAGATGGTTCTTAGTAGCACAAACGCAAAGGACTCCAC
 AATAACCACAAATGCATCCGAGGAGAGGACCAGTGACACAAAGGAGGAAACTAATCCTTCAAAGATGTTGCAATAGTAGTGG
 ATAGACCTATGGAAGCACGTATCATGCACTCTTCAGAAGGAAAGGAGGACTATTTGAGCATAAAAATGGAAAAGGATTCTATGG
 AAATCTTGTGTTTATGCAATCACATTGATGATGTTGATTGCAATGCTTCTTGGTGTAATATGGCATGGGCTGCAATTGCAGC
 TGCAATAATTTTGGTGGTGCTTGATTTCAAAGATGCAGGGCCAAGCATAGACAAGGTCTCTTATTCACTTTTGATATTCTTCT
 GTGGAATGTTTATCACAGTAGATGGCTTCAAGAAAAGTGAATTTCAAGTGCTCTGTGGGACTTAATGGAGCCTTATTCTAGA
 ATAGATCATGCTACTGGAATAGCTACACTTGCTGTAGTTATACTTGTCTATCAAATTTGGCTTCAAATGTACCAACTGTTCT
 GTTGCTTGGAGCAAGAAGTTGCAGCCTCAGCTGCTGCAATTTCAAAGAAGATGAGAAGAAGGCATGGCTAATCCTAGCTTGG
 GTGAGCACAGTAGCAGGAACTTTTCACTATTAGGATCAGCTGCCAAGTGGTGTGTGTGAACAAGCTCGTAGAGCTCCAAA
 CGTTGGATACACATTAACCTTTTGGACCCATCTCAAATTCGGTCTTCTTCAACTCTCATAGTCACTGCTATTGGATTGACCC
 TCATAAAGTATAAAACAATCACTAAATGAGAAATTTACACAAGCAGAATAGGTTCAATTTGTAACACATTTTAAGGTTGTGTG
 AGAGAATACCGGAGATACATGTACATTAACATAGGATATAGGATTTCTCTATTTTTTTTTTATCATTTACATCATCAAATAAA
 TGTATGATCATGATGATCCTAGCAAAAAGTTTGTAGGAATCTCTGGATTTTCAGCTTATAATAAAAATGTCAGTTTTTCATGT
 G

Tentative Annotation:

similar to UniRef100_A7QG37**Cluster: Chromosome undetermined scaffold_91, whole genome shotgun sequence; n=1;****Vitis vinifera|Rep: Chromosome undetermined scaffold_91, whole genome shotgun****sequence - Vitis vinifera (Grape), partial (37%)**

Description	Hit coverage	% ID	% Sim
<i>similar to</i> UniRef100_Q1RU51 Cluster: Transporter putative; n=1; Medicago truncatula Rep: Transporter putative - Medicago	<i>partial</i> (38%)	82.04	93.69