UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MILENA MOURA DE ARAUJO BIAZUZO

Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum

Piracicaba
2013

MILENA MOURA DE ARAUJO BIAZUZO

Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profª. Dra. Siu Mui Tsai

Piracicaba
2013

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

Biazuzo, Milena Moura de Araujo

Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum / Milena Moura de Araujo Biazuzo; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2013.

177 p.: 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. Eletroforese em gel 3. Estresse oxidativo 4. Expressão gênica 5. Feijão 6. Genética molecular 7. Marcadores moleculares 8. Transcrição gênica 9. Transgenes 10. Umidade do solo I. Título

CDU 575.111 : 635.652

DEDICO

Ao meu esposo Danilo Biazuzo, que é meu porto seguro e tem me apoiado desde o início de minha jornada científica, dando-me suporte emocional e guiando-me pelo caminho da persistência.

Aos meus pais, Micael Moura de Araujo e Rosângela Aparecida Botaro de Araujo e meus avôs, Paulo Araújo da Silva, Luiza Moura de Araujo, Orides Botaro e Maria José Dias Palhão pelos ensinamentos éticos e pelo amor que me proporcionaram ao longo do meu desenvolvimento como ser humano.

OFEREÇO

A todos aqueles que se dedicam à genética, aplicada ao melhoramento de plantas, visando à melhoria das condições de cultivo para os agricultores e à qualidade dos alimentos para os consumidores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo amor incondicional e por todo aprendizado que me proporcionou, tanto no âmbito pessoal quanto no profissional, durante esses últimos quatro anos.

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por terem fornecido a estrutura necessária à realização do meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Estudos e da Reserva Técnica.

À profª. Dra. Siu Mui Tsai pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento desse trabalho, pela orientação e pela contribuição ao trabalho.

À pós-doutora Danielle Gregório Gomes Caldas pelos ensinamentos das práticas laboratoriais e pela contribuição ao trabalho.

À Ludmila Barrios de Campos por ajudar a solucionar problemas cotidianos.

Ao pessoal do laboratório: Ana Carolina Zakir, Beatriz Maria Ferrari, Fernanda Cassieri, Fabiana de Souza Cannavan, Amanda Barbosa Lima, Lina Wong, Mariana Germano, Fernanda Nakamura, Marcela Arnaldo, Marina Dellias, Ana Luiza Ahern Beraldo, Aline Borges, Enéas Ricardo Konzen, Gustavo Henrique Recchia, Felippe Buck Campana, Maria Júlia de Lima Brossi, Lucas William Mendes, Ezio Nalin de Paulo, Naissa Maria Silvestre, Clóvis Daniel Borges, Denis Göss e Acácio Aparecido Navarrete, pela convivência diária.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Fábio Duarte, Wagner Piccinini, José Elias Gomes e Chiquinho que forneceram uma ajuda indispensável ao desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários da Seção de Pós-Graduação do CENA, pelo empenho.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir. Uma pessoa não pode deixar de se sentir reverente ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que a pessoa tente apenas compreender um pouco mais desse mistério a cada dia. Nunca perca uma sagrada curiosidade.”

(Albert Einstein)

RESUMO

BIAZUZO, M. M. A. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico em feijoeiro comum.** 2013. 177 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas, entretanto, um dos maiores problemas enfrentados por essa cultura é o déficit hídrico, que leva a uma redução considerável em seu rendimento. Dessa forma, a identificação de genes que controlam os mecanismos de defesa e adaptação do feijoeiro à falta de água durante o seu desenvolvimento é de grande utilidade. E, como a tolerância à seca é um caráter multigênico, genótipos com diferentes graus de tolerância apresentam expressão gênica diferencial, com ativação e/ou repressão de determinados genes. Diante disso, esse trabalho teve como objetivos: (i) identificar genes diferencialmente expressos em dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante (BAT 477) e o outro suscetível (IAC-Carioca 80SH) à seca; (ii) verificar a expressão gênica espacial (em raízes, caules e folhas) e temporal (cinco níveis crescentes de déficit hídrico – 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de exposição ao estresse) por meio de *RT-qPCR*; (iii) predizer a função dos genes identificados, com base nos genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana,* usando dados públicos de microarranjo disponíveis na plataforma *Genevestigator*. Para atingir esses objetivos, foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, sendo induzido o déficit hídrico, por meio da suspensão da irrigação, quando as plantas atingiram o estádio fenológico R_5, mantendo sob suprimento hídrico adequado as plantas-controle. Foi então utilizada a técnica de *cDNA-AFLP* para isolar os transcritos diferencialmente expressos entre os dois genótipos, sob seca, a qual aliada ao sequenciamento possibilitou a identificação e anotação de 45 transcritos, sendo 21 exclusivamente expressos no genótipo tolerante e 24 no genótipo suscetível. Dentre os transcritos identificados no genótipo tolerante, podem ser listados pelo menos 11, com potencial de serem usados para transformação genética (*chlorophyll A-B binding protein*, *HSP40*, *HSP70*, *glycosyl hydrolase*, *serine/threonine protein kinase*, *trehalose-6-phosphate synthase*, *E3 ubiquitin ligase*, *fructose biphosphate aldolase*, *mediator complex subunit 13*, *aquaporin nodulin MTN-3-related* e *TCP transcription factor*), e no genótipo suscetível, podem ser listados nove (*coatomer protein complex*, *monoamine-oxidase A repressor R1*, *synaptobrevin*, *haloacid dehalogenase-like hydrolase*, *ADP-ribosylation factor*, *mTERF*, *serine protease S1C HtrA-related*, *legume lectin* e *SWI/SNF-related chromatin binding*). Na análise de expressão gênica espacial e temporal, os transcritos mais promissores para uso em trabalhos futuros de transformação genética foram: *aquaporin nodulin MTN3*, *E3 ubiquitin ligase*, *serine/threonine protein kinase*, *glycosyl hydrolase* e *HSP 70 protein*, uma vez que tiveram uma expressão bastante pronunciada no genótipo tolerante. Através das análises *in silico*, baseadas nos genes ortólogos de *A. thaliana*, foram descobertos processos e vias metabólicas que podem estar envolvidos na resposta do feijoeiro comum ao déficit hídrico. Além disso, foram identificados genes associados com a tolerância à seca, corroborando os dados experimentais. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho fornecem o entendimento necessário ao desenvolvimento de ferramentas moleculares (marcadores para genes diferencialmente regulados) para serem utilizados em programas de melhoramento, bem como para informação genética básica na anotação funcional do genoma do feijoeiro e também para utilização desses genes candidatos em trabalhos de transformação genética para obtenção de plantas mais tolerantes à seca.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Transcritoma. Eletroforese. PCR em tempo real.

ABSTRACT

BIAZUZO, M. M. A. **Differential expression analysis of genes related to drought stress tolerance in common bean.** 2013. 177 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Brazil is the largest producer of common beans, with average annual production of 3.5 million tonnes; however, one of the biggest problems faced by this crop is drought, which leads to a considerable reduction in their yield. Thus, the identification of genes that control the defense mechanisms and adaptation of common bean to drought during its development is very useful. Drought tolerance is a multigenic character, so genotypes with different degrees of water deficit tolerance exhibit differential gene expression, with activation and/or repression of certain genes. Therefore, this study aimed to: (i) identify differentially expressed genes in two common bean genotypes, one tolerant (BAT 477) and other susceptible (IAC-Carioca 80SH) to drought, (ii) verify the spatial (root, stem and leaves) and temporal (five increasing levels of water deficit - 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h of stress exposition) gene expression by RT-qPCR (iii) predict the genes function, based on *Arabidopsis thaliana* orthologous genes, using available data in the public microarray platform Genevestigator. To achieve these objectives, an experiment was conducted in a green house, being induced water deficit, by withholding water when the plants reached growth stage R_5, maintaining adequate water supply under the control plants. To isolate transcripts differentially expressed between the two genotypes under drought was used the cDNA-AFLP technique, which coupled with sequencing enabled the identification and annotation of 45 transcripts, 21 exclusively expressed in the tolerant genotype and 24 in the susceptible one. Among the transcripts identified in the tolerant genotype, may be listed at least 11, with potential to be used in genetic transformation (chlorophyll A-B binding protein, HSP40, HSP70, glycosyl hydrolase, serine/threonine protein kinase, trehalose-6-phosphate synthase, E3 ubiquitin ligase, fructose biphosphate aldolase, mediator complex subunit 13, aquaporin nodulin MTN-3-related and TCP transcription factor), and in the susceptible genotype, can be listed nine (coatomer protein complex, monoamine-oxidase A repressor R1, synaptobrevin, haloacid dehalogenase-like hydrolase, ADP-ribosylation factor, mTERF, serine protease S1C HtrA-related, legume lectin and SWI/SNF-related chromatin binding). In the spatial and temporal gene expression analysis, the transcripts that stood out for use in genetic transformation future studies were: aquaporin nodulin MTN3, E3 ubiquitin ligase, serine/threonine protein kinase, glycosyl hydrolase and HSP 70 protein, since it had an expression quite pronounced in the tolerant genotype. Through the *in silico* analysis, based on orthologous genes of *A. thaliana*, was discovered processes and metabolic pathways that may be involved in the common bean response to drought. In addition, we identified genes associated with drought tolerance, corroborating the experimental data. Thus, the present results provide the necessary understanding to develop molecular tools (markers for differentially regulated genes) to be used in breeding programs, as well as basic genetic information in the common bean functional genome annotation and also to use these candidate genes for genetic transformation to obtain drought-tolerant plants.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Transcriptome. Electrophoresis. Real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Experimento conduzido em casa-de-vegetação 55

Figura 2 – Plantas no momento da coleta 55

Figura 3 - Raízes dos dois genótipos, sob 72 horas de déficit hídrico 63

Figura 4 - Géis de agarose 1,5% 64

Figura 5 - Atividade da enzima catalase 66

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 67

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 68

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 69

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 70

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 71

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 72

Figura 12 - Diagramas de Venn 73

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 78

Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. 79

Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% 80

Figura 16 - Modelo de resposta sistêmica à seca em plantas 90

Figura 17 - Expressão relativa, por RT-qPCR, entre o genótipo tolerante e o suscetível, ambos sob seca. 92

Figura 18 - Géis de poliacrilamida 6% 111

Figura 19 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito *DREB2C* 113

Figura 20 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B7R (*ribosomal protein S7e*) 114

Figura 21 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito R8 (*aconitate hydratase*) 115

Figura 22 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito R15 (*serine protease S1C HtrA-related*) 117

Figura 23 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B1C (*HSP 70 protein*) 119

Figura 24 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B3C (*glycosyl hydrolase*) 120

Figura 25 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B6C (*serine/threonine protein kinase*) 122

Figura 26 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C1C (*S-adenosylmethionine synthetase*) 123

Figura 27 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C6C (*legume lectin*) 125

Figura 28 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C5 (*E3 ubiquitin ligase*) 126

Figura 29 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B5F (*aquaporin nodulin MTN3*) 127

Figura 30 - Padrões de expressão gênica, por *RT-qPCR* 146

Figura 31 - Padrões de expressão, dos genes ortólogos de *Arabidopsis*, sob seca, nos diferentes órgãos vegetais 149

Figura 32 - Rota metabólica de glutationa 151

Figura 33 - Rota metabólica de biossíntese de fenilpropanóides 152

Figura 34 - Rota metabólica de amido e sacarose 153

Figura 35 - Rota metabólica da cisteína e da metionina 154

Figura 36 - Processo fotossintético 156

Figura 37 - Metabolismo do nitrogênio 157

Figura 38 - Genes corregulados sob seca 159

Figura 39 - Processamento de proteínas no retículo endoplasmático..... 161

Figura 40 - Ciclo do ácido cítrico..... 162

Figura 41 - Metabolismo de purinas..... 163

Figura 42 – Metabolismo de frutose e manose..... 164

Figura 43 - Rota metabólica de biossíntese de lisina..... 165

Figura 44 - Genes corregulados sob seca 167

Figura 45 - *Heat map* com agrupamento hierárquico dos genes ortólogos de *A. thaliana*, correspondentes aos TDFs de *P. vulgaris* 169

Figura 46 - Análise *Signature*..... 170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala fenológica do feijoeiro comum 56

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores usados para as reações de pré-amplificação e amplificação seletiva 59

Tabela 3 - Sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os genes-alvo, através de *RT-qPCR* 62

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores, desenhados com base nas sequências dos genes de referência 62

Tabela 5 - Análise de variância para experimento em blocos casualizados. 65

Tabela 6 - Transcritos preferencialmente expressos no genótipo tolerante 74

Tabela 7 - Transcritos preferencialmente expressos no genótipo suscetível 76

Tabela 8 - Sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os genes de referência e os genes-alvo, através de *RT-qPCR* 108

Tabela 9 - Sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os genes de referência e os genes-alvo, através de *RT-qPCR* 141

Tabela 10 - Genes de *A. thaliana*, ortólogos aos TDFs de feijão comum, isolados por cDNA-AFLP, os quais apresentaram-se induzidos no genótipo tolerante (BAT 477) 147

Tabela 11 - Genes de *A. thaliana*, ortólogos aos TDFs de feijão comum, isolados por cDNA-AFLP, os quais apresentaram-se induzidos no genótipo suscetível (IAC-Carioca 80SH) 148

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **21**

2 REVISÃO DE LITERATURA **23**

2.1 Importância econômica e social do feijão comum *23*

2.2 O déficit hídrico na cultura do feijoeiro comum *25*

2.3 Atividades metabólicas e celulares afetadas pelo déficit hídrico *26*

2.4 Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico *28*

2.5 Melhoramento genético visando tolerância ao déficit hídrico *36*

2.6 Técnicas utilizadas para o estudo da expressão gênica *38*

REFERÊNCIAS 40

3 IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS SOB DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM **51**

3.1 INTRODUÇÃO **53**

3.2 MATERIAL E MÉTODOS **54**

3.2.1 Material vegetal e indução dos genes de tolerância à seca *54*

3.2.2 Medição da atividade da catalase *56*

3.2.3 Extração de RNA total *57*

3.2.4 Técnica de cDNA-AFLP *58*

3.2.4.1 Obtenção do cDNA 58

3.2.4.2 Digestão, pré-amplificação e amplificação seletiva do cDNA 58

3.2.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 59

3.2.4.4 Sequenciamento dos fragmentos derivados dos transcritos 60

3.2.5 Validação da técnica de cDNA-AFLP através de RT-qPCR *61*

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **63**

3.3.1 Experimento em casa-de-vegetação *63*

3.3.2 Extração de RNA total *63*

3.3.3 Atividade da enzima catalase *65*

3.3.4 Técnica de cDNA-AFLP *66*

3.3.4.1 Transcritos detectados preferencialmente no genótipo tolerante 81

3.3.4.2 Transcritos detectados preferencialmente no genótipo suscetível 85

3.3.4.3 Transcritos detectados em ambos os genótipos 88

3.3.4.4 Análise da expressão dos transcritos (BAT 477 vs IAC-Carioca 80SH) 89

3.3.4.5 Resposta sistêmica ao déficit hídrico 89

2.3.5 Validação da técnica de cDNA-AFLP através de RT-qPCR *91*

3.4 CONCLUSÕES **92**

Referências 92

4 EXPRESSÃO GÊNICA ESPACIAL E TEMPORAL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM **101**

4.1 INTRODUÇÃO **103**

4.2 MATERIAL E MÉTODOS **105**

4.2.1 Material vegetal e indução dos genes de tolerância à seca *105*
4.2.2 Técnica de cDNA-AFLP..... *106*
4.2.3 Expressão gênica espacial e temporal por RT-qPCR..... *107*
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **110**
4.3.1 Obtenção dos TDFs *110*
4.3.2 Análise da expressão gênica espacial e temporal *111*
4.3.2.1 Transcrito *DREB2C* 112
4.3.2.2 Transcrito B7R (*ribosomal protein S7e*)..... 113
4.3.2.3 Transcrito R8 (*aconitate hydratase*) 115
4.3.2.4 Transcrito R15 (*serine protease S1C HtrA-related*)..... 116
4.3.2.5 Transcrito B1C (*HSP 70 protein*) 118
4.3.2.6 Transcrito B3C (*glycosyl hydrolase*) 119
4.3.2.7 Transcrito B6C (*serine/threonine protein kinase*) 121
4.3.2.8 Transcrito C1C (*S-adenosylmethionine synthetase*) 122
4.3.2.9 Transcrito C6C (*legume lectin*)..... 124
4.3.2.10 Transcrito C5 (*E3 ubiquitin ligase*) 125
4.3.2.11 Transcrito B5F (*aquaporin nodulin MTN3*)..... 127
4.4 CONCLUSÕES **128**
Referências..... 129

5 ANÁLISES *IN SILICO* DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM.....**135**

5.1 INTRODUÇÃO..... **137**
5.2 MATERIAL E MÉTODOS **139**
5.2.1 Obtenção das sequências dos transcritos *139*
5.2.2 Estudo de expressão gênica espacial e temporal por RT-qPCR *140*
5.2.3 Análise in silico dos genes ortólogos de Arabidopsis thaliana *142*
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **143**
5.3.1 Análise da anatomia..... *149*
5.3.2 Análise da corregulação de genes *158*
5.3.3 Análise de agrupamento hierárquico dos genes ortólogos de A. thaliana..... *168*
5.3.4 Análise Signature *169*
5.4 CONCLUSÕES **171**
Referências..... 171

1 INTRODUÇÃO

O déficit hídrico é o principal estresse abiótico responsável pela redução do rendimento em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no mundo todo. Diante do cenário atual de mudanças climáticas, com o aquecimento global e com as previsões de piora do quadro de escassez de água nas regiões agrícolas, além das perspectivas de crescimento populacional, com redução de áreas agricultáveis, é importante que a adaptação à seca torne-se o principal objetivo dos programas de melhoramento genético de plantas, tanto públicos quanto privados.

Genótipos com diferentes graus de tolerância ao déficit hídrico apresentam expressão gênica diferencial, com ativação e/ou repressão de determinados genes. A tolerância à seca é um caráter multigênico, então, os genes diferencialmente expressos em um genótipo tolerante quando comparado com um suscetível, podem ser responsáveis por conferirem tolerância à planta. Sendo assim, a fim de se obter melhorias expressivas, torna-se imprescindível a investigação da base genética dessa tolerância, identificando cada vez mais genes atuantes nesses mecanismos, a fim de que eles possam ser usados no melhoramento convencional através de cruzamentos, ou ainda na biotecnologia, através de transformação genética, possibilitando a obtenção de plantas mais tolerantes.

Já foi estabelecido que as plantas respondem e se adaptam à seca através da modificação dos níveis transcricionais de um grande número de genes (SEKI et al., 2002). Os genes, de maneira geral, se expressam diferencialmente nos órgãos das plantas, podendo ser classificados em dois grupos principais, com base em seus produtos, em efetores ou reguladores, os quais também podem ser designados como genes de resposta tardia ou de resposta precoce, baseados em seu tempo de resposta (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006), ou seja, a expressão gênica também é variável ao longo do tempo de exposição ao estresse (havendo momentos de indução e outros de repressão).

Os recursos genômicos e genéticos, tais como anotação dos genes e linhagens mutantes, ainda são escassos para o feijoeiro comum, sendo assim, a análise transcritômica é um caminho rápido e barato para estudar genes regulados diferencialmente sob estresse, levando à caracterização de passos-chave nas respostas de defesa, possibilitando a comparação com *Arabidopsis thaliana*, que é um organismo-modelo para estudos genéticos (OBLESSUC et al., 2012), e portanto, já foi extensivamente estudado e anotado.

Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram: (i) identificar transcritos diferencialmente expressos em dois genótipos de feijoeiro comum contrastantes para tolerância à seca – BAT 477 (tolerante) e IAC-Carioca 80SH (suscetível); (ii) traçar os perfis de expressão gênica, de alguns transcritos selecionados, considerando tanto a expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) quanto a temporal (cinco coletas com níveis crescentes de déficit hídrico – 24h, 48h, 72h, 96h e 120 h de exposição ao estresse); (iii) predizer a função dos genes identificados, com base nos genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*, usando dados públicos de microarranjo disponíveis na plataforma *Genevestigator*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica e social do feijão comum

O gênero *Phaseolus* é originário das Américas e possui 55 espécies, cinco das quais são amplamente cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. e *P. polyanthus* G. (DEBOUCK, 1993). Dessas cinco espécies, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a mais importante, devido a seu elevado teor de proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras, sendo a principal cultura alimentícia na África e na América Latina (YU; BLISS, 1978). Os feijões comuns cultivados são divididos em dois *pools* gênicos (mesoamericano e andino), com diversas raças dentro desses *pools* (BEEBE et al., 2000).

Além de ser um dos alimentos básicos da população brasileira (70% dos brasileiros consomem feijão diariamente), é também um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta dos estratos sociais economicamente menos favorecidos, e, juntamente com o arroz, forma a base da alimentação brasileira (BRASIL, 2013).

O feijão é cultivado em mais de 100 países, porém 63% da produção mundial é obtida em apenas cinco, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor de feijão comum, com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas. Os maiores Estados produtores de feijão no Brasil são, Paraná, que colheu 767 mil toneladas na safra 2012/2013, e Minas Gerais, com a produção de 684 mil toneladas no mesmo período (CONAB, 2013). Apenas de 8% a 10% da produção nacional destina-se à exportação, sendo a maior parte da produção consumida pelo mercado interno. Não obstante o grande volume de produção nacional, o Brasil é importador desse produto e a quantidade importada varia em função dos resultados das safras. Nos últimos anos foram importadas, em média, cerca de 100 mil toneladas. Da quantidade importada, a maior parte é de feijão preto, seguido pelo feijão colorido e menos de 1% é de outros tipos de feijões. Os principais países que exportam para o Brasil são Argentina, Chile, Estados Unidos e Bolívia (MAPA, 2013). Cabe ressaltar que a produção mundial de feijão poderia ter um aumento de 30% a 40%, se as perdas causadas por estresses bióticos e abióticos (ferrugem, seca, calor e frio) fossem prevenidas (SHARMA et al., 2005; CANCI; TOKER, 2009).

Além da importância econômica, essa cultura agrícola apresenta importância social, devido principalmente à mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura (EMBRAPA, 2011) e também desempenha uma importante função em sistemas agrícolas familiares, visto que mantém a fertilidade do solo, por meio da fixação do nitrogênio atmosférico através da associação simbiótica com bactérias (KUMAR et al., 2012).

A cultura do feijoeiro comum é extremamente diversa em termos de métodos de cultivo, usos, variedade de ambientes em que é adaptada e variedade morfológica, sendo encontrada desde o nível do mar até 3000 metros de altitude, podendo ser cultivada em monocultura, em associação ou em rotação com outras culturas, e sendo consumida como grão maduro, semente imatura e vegetal (folhas e vagem).

Devido à diversidade fisiográfica do Brasil e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, a safra do grão é divida em três etapas: (i) safra das águas: a semeadura ocorre em um período em que há um elevado índice pluviométrico, ocorrendo na região centro-sul, de agosto a dezembro, e no nordeste, de outubro a fevereiro; (ii) safra da seca: a semeadura é realizada em um período com índice pluviométrico um pouco menor, geralmente de dezembro a março; (iii) safra irrigada: a semeadura é realizada no período com o menor índice pluviométrico, tendo o plantio concentrado na região centro-sul, de abril a junho (BRASIL, 2013).

A temperatura e as chuvas são os elementos climáticos que mais influenciam na produção de feijão. As altas temperaturas prejudicam o florescimento e a frutificação do feijoeiro, enquanto as baixas podem provocar a perda das flores. Alta temperatura acompanhada de baixa umidade relativa do ar e ventos fortes dificulta a retenção de vagens, podendo até mesmo inviabilizar o cultivo de feijão em algumas regiões (BRASIL, 2013).

Apesar de a área plantada com feijão comum estar praticamente estagnada nos últimos anos, sua produção tem crescido devido à introdução de variedades mais produtivas e mais resistentes, e também pela inserção de um número maior de produtores empregando novas tecnologias agrícolas, embora grande parte da atividade ainda esteja nas mãos de pequenos produtores, pouco tecnificados, principalmente na região nordeste. Dessa forma, um dos principais problemas ainda enfrentados pelos produtores de feijão é o déficit hídrico, devido à inviabilidade financeira para instalação de sistemas eficientes de irrigação.

2.2 O déficit hídrico na cultura do feijoeiro comum

A cultura do feijoeiro comum requer entre 200 e 400 mm de água durante seu crescimento e desenvolvimento, mas estima-se que mais de 73% do total da produção na América Latina e 40% do total na África ocorram sob condições microclimáticas que apresentam de moderado a severo déficit hídrico em algum momento durante seu cultivo (BROUGHTON et al., 2003). Solos muito secos para produção de alimentos cobrem, aproximadamente, 28% da superfície da Terra (BRAY, 2004), e, somente 7% das áreas agrícolas cultivadas com feijoeiro comum são adequadamente irrigadas. Além disso, modelos climáticos predizem que várias regiões onde a seca já é um problema, tais como áreas do leste e sudeste africano, se tornarão cada vez mais secas nas próximas décadas (JONES; THORNTON, 2003).

As plantas sofrem com o déficit hídrico quando o fornecimento de água às raízes torna-se difícil ou quando a taxa de transpiração torna-se muito alta, sendo que essas duas condições ocorrem frequentemente em climas áridos e semiáridos. É comumente aceito que, sob condições de transpiração normal, a água se movimenta do solo para o xilema das raízes, seguindo preferencialmente a via apoplástica, a qual é governada por um gradiente de pressão hidrostática; contudo, quando a transpiração é restrita por condições estressantes, tais como a seca, a maior parte da água segue a via célula-a-célula, fluindo através das membranas celulares muito mais lentamente (STEUDLE, 2000).

Dentre os estresses ambientais, a seca e o frio são fatores-chave que afetam o crescimento das plantas, bem como o rendimento (GUO et al., 2011). O efeito do déficit hídrico na planta é bastante complexo, causando modificações anatômicas, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A seca afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e das raízes, causando: redução na expansão celular, na condutância hidráulica estomática e radicular, na fotossíntese e, consequentemente, no acúmulo de matéria seca (SIEMENS; ZWIAZECK, 2004; VANDELEUR et al., 2005). Além disso, provoca o aborto de flores, a queda de vagens, a redução da granação (MASAYA; WHITE, 1991), do número de dias para a planta atingir a maturidade (NIELSEN; NELSON, 1998; RAMIREZ-VALLEJO; KELLY, 1998), da captação de fósforo e da fixação de nitrogênio (SERRAJ; SINCLAIR, 1998; SANTOS et al., 2004).

Cabe ressaltar que as plantas parecem responder de forma similar ao estresse abiótico e à senescência sob condições naturais, afetando o acúmulo de biomassa. Dentre os genes que são induzidos durante a senescência das folhas, há muitos cujos níveis dos transcritos também se acumulam tanto sob estresse abiótico, quanto sob estresse biótico (SHIMON et al., 2003).

Os efeitos do déficit hídrico em feijoeiro comum podem ser tecido-específicos e/ou sistêmicos (ACOSTA-GALLEGOS; KOHASHI-SHIBATA, 1989; ACOSTA-GALLEGOS; ADAMS, 1991; MUÑOZ-PEREA et al., 2006; BEEBE et al., 2011), sendo principalmente dependentes da frequência, duração e intensidade do estresse e do estádio de desenvolvimento da cultura (RAMIREZ-VALLEJO; KELLY, 1998). A baixa disponibilidade de água no solo é um fator limitante para a produção do feijão, especialmente em três estádios críticos, que são a germinação, o florescimento e a granação (SORATTO et al., 2003). O requerimento hídrico e a frequência de irrigação aumentam conforme as plantas se desenvolvem e a cobertura do solo ou índice de área foliar aumenta. Da mesma forma, os efeitos adversos do déficit hídrico aumentam quando a cultura se torna mais sensível à seca, durante o pré-florescimento e o estádio reprodutivo. O requerimento hídrico do feijão comum declina após o período da granação. Além disso, se espera que as cultivares precoces tenham um requerimento hídrico mais baixo do que as intermediárias e tardias (MUÑOZ-PEREA et al., 2006).

Dentre as diversas respostas de adaptação das plantas ao déficit hídrico a principal é a indução de genes específicos (INGRAM; BARTELS, 1996), sendo que alguns desses genes são expressos durante a embriogênese, fase em que as sementes dessecam e os embriões tornam-se dormentes (THOMAS; VIVEKANANDA; BOGUE, 1991).

Em suma, as diversas respostas da planta ao déficit hídrico são controladas por um conjunto de genes com variadas funções. Conforme a água é perdida pelas células, processos regulatórios são iniciados para ajustar o metabolismo celular para as novas condições (BRAY, 1993). Diante disso, estudos fisiológicos e moleculares da tolerância à seca no feijoeiro comum são essenciais para encontrar características e genes envolvidos nessa tolerância (BROUGHTON et al., 2003).

2.3 Atividades metabólicas e celulares afetadas pelo déficit hídrico

A disponibilidade de água é um dos fatores mais importantes que determina a distribuição geográfica e a produtividade das plantas (BARTELS, 2001). A resposta e a adaptação das plantas a condições de déficit hídrico são muito complexas e altamente

variáveis. Ao longo da evolução, ao tornarem-se organismos sésseis, as plantas desenvolveram diversas estratégias para adquirir tolerância a estresses. Essas estratégias incluem mudanças nos processos metabólicos, alterações estruturais de membranas, expressão de genes específicos e produção de metabólitos secundários (RAMANJULU; BARTELS, 2002).

A seca afeta não somente as relações hídricas, mas também induz o fechamento dos estômatos e reduz a taxa fotossintética e o crescimento. Mudanças na habilidade fotossintética da planta são indicativas do início da senescência. Quando uma planta está passando por seca, frio ou outro tipo de estresse, substâncias prejudiciais são acumuladas. Nesse cenário, o metabolismo e o transporte também são afetados (GUO et al., 2011). O fechamento dos estômatos reduz a concentração de CO_2 no mesofilo foliar e resulta na acumulação de NADPH. Sob tais condições, onde o NADP é um fator limitante, o oxigênio atua como um aceptor alternativo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, que ocorre nas membranas tilacóide, resultando na formação de radicais superóxido (ZLATEV et al., 2006).

O destino de células sob ambientes estressantes é determinado pela duração do estresse, bem como pela capacidade protetora da planta. A sequência de eventos que ocorre em tecidos vegetais sujeitos a déficit hídrico é: (i) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (da sigla em inglês, ROS) e de moléculas-alvo oxidadas; (ii) aumento da expressão de genes com funções antioxidantes; (iii) aumento nos níveis dos sistemas antioxidantes; (iv) aumento da capacidade de eliminação de ROS, resultando em tolerância ao estresse hídrico (MANO, 2002). Embora uma série de mecanismos regulatórios tenha evoluído dentro das células vegetais para limitar a produção dessas moléculas tóxicas, o dano oxidativo permanece como um problema em potencial, visto que essas moléculas causam perturbações no metabolismo, como por exemplo, a perda de coordenação entre os processos de produção e utilização de energia durante a fotossíntese, em ambientes estressantes.

As membranas celulares são frequentemente o alvo primário dos processos de degradação induzidos pela seca. Sendo assim, a manutenção da integridade da membrana é crítica para a proteção da planta sob déficit hídrico (MONTEIRO DE PAULA et al., 1990). A fluidez da membrana celular pode influenciar na sua estabilidade durante o estresse, podendo ser otimizada por ajustes na composição de lipídeos e ácidos graxos, na estrutura e no nível de saturação, portanto, alterações nas propriedades das membranas em resposta à seca são importantes para a adaptação ao estresse (NAVARI-IZZO et al., 1993). Contudo, a seca ocasiona um aumento gradativo na perda de eletrólitos e um aumento no teor de ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico), enquanto o teor de ácidos graxos poli-insaturados (linoléico

e linolênico) apresenta decréscimo (MARTINS-JÚNIOR et al., 2008). O desequilíbrio na relação ácidos graxos saturados/insaturados conduz a um aumento no índice de saturação, podendo reduzir a qualidade nutricional dos grãos.

Como foi evidenciado, o déficit hídrico interfere em uma série de atividades metabólicas e celulares das plantas, que por muitas vezes, provocam um desequilíbrio metabólico, principalmente nas plantas suscetíveis, levando-as à senescência precoce e impossibilitando que tenham um rendimento satisfatório, daí a importância de se entender os diferentes mecanismos de tolerância a esse tipo de estresse.

2.4 Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico

Há vários mecanismos que permite às plantas tolerar a falta de água, sendo a adaptação à seca uma função multigênica, dependente de várias características fisiológicas e morfológicas (PIMENTEL et al., 1990). Portanto, genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico apresentam diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica.

As respostas das plantas à seca podem envolver alterações deletérias e/ou adaptativas. Em particular, se a seca ocorre sob condições de campo, a resposta da planta pode ser modificada sinergisticamente. Respostas precoces das plantas ao déficit hídrico ajudam a planta a sobreviver por algum tempo, enquanto a aclimatação de plantas sujeitas à seca é indicada pela acumulação de certos metabólitos novos associados com a capacidade estrutural para melhorar o funcionamento da planta sob déficit hídrico (PINHERO et al., 1997).

A expressão de genes, direcionada por estresses, frequentemente depende de modificações pós-traducionais da histona e, por algumas vezes, da metilação do DNA. Essas modificações de DNA e histona desempenham uma função-chave na expressão gênica e no desenvolvimento das plantas sob estresses. Muitas dessas modificações induzidas retornam ao seu nível original assim que o estresse passa, enquanto algumas dessas modificações podem se tornar estáveis, isto é, podem ser carregadas adiante como um tipo de “memória do estresse” e podem ser herdadas através de divisões mitóticas ou até mesmo meióticas. Essa memória epigenética do estresse pode auxiliar as plantas a lidar mais efetivamente com eventos estressantes subsequentes (CHINNUSAMY; ZHU, 2009).

Cabe ressaltar que a tolerância ou suscetibilidade de uma planta a estresses abióticos é um fenômeno extremamente complexo, envolvendo a expressão coordenada de vários genes, os quais estão envolvidos em uma série de mecanismos de tolerância ao déficit hídrico A seguir são apresentados com mais detalhes alguns desses mecanismos:

a) Sinalização

Uma via de transdução de sinais começa com a percepção do sinal, nesse caso o estresse, por proteínas receptoras, as quais levam esse sinal para mensageiros primários e secundários. Os sinais secundários podem ser fitormônios, tais como o ácido abscísico (ABA) e o etileno, além de outras moléculas como o Ca^{2+}, ROS e fosfolipídeos (XIONG; ZHU, 2002). Em seguida, genes responsivos ao estresse controlados por proteínas regulatórias (fatores de transcrição, *mitogen activated*, quinases dependentes de cálcio e fosfolipases), codificam proteínas funcionais ou novamente proteínas regulatórias para reiniciar o processo (SHINOZAKI; DENNIS, 2003). A complexidade das famílias gênicas que codificam para moléculas sinalizadoras, proteínas quinase e fatores de transcrição, confere a flexibilidade das respostas das plantas aos estresses ambientais.

O cálcio é um mensageiro secundário universal. Alterações nos níveis citossólicos de Ca^{2+} são sentidas pelas proteínas quinase cálcio-dependentes (CDPKs), as quais modificam o estado fosforilativo das proteínas (KNIGHT; KNIGHT, 2001).

As proteínas quinase do tipo *mitogen activated* ou MAPKs desempenham uma importante função na sinalização celular, visto que amplificam e transmitem os sinais através de uma série de eventos fosforilativos (de MAPKKK para MAPKK até MAPK) (CARDINALE et al., 2002). Os alvos das MAPKs podem ser proteínas quinase bem como vários fatores de transcrição. Adicionalmente, as vias de sinalização de MAPK podem regular a produção de ROS (PITZSCHKE; HIRT, 2009). E, atualmente, a histidina-quinase tem sido identificada como um osmossensor em leveduras e plantas. Ela ativa a via de transdução de sinais MAPK para induzir a tolerância ao sal nesses organismos (DUAN et al., 2009).

b) Ácido Abscísico (ABA)

Os estresses: salino, hídrico e, em menor nível, ao frio, aumentam os níveis de ABA (NAMBARA; MARION-POLL, 2005), o qual também aumenta a expressão de muitos, mas não de todos os genes responsivos à seca (LI et al., 2006).

O ABA é reconhecidamente importante para a tolerância à seca por mediar a sinalização das células-guarda e o fechamento dos estômatos, para prevenir a perda de água.

Além disso, controla a expressão de muitos genes relacionados ao déficit hídrico. As vias de sinalização do estresse podem ser ABA-dependentes ou ABA-independentes. Muitos genes ABA-dependentes induzidos por estresse contêm um motivo conhecido como elemento responsivo ao ABA, denominado ABRE (ZHANG et al., 2006), o qual é um sítio-alvo de ligação para fatores de transcrição *B-zip* (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000). Adicionalmente, a expressão de genes pode ser controlada pelos fatores de transcrição *MYC* e *MYB*, ambos induzidos por ABA (RIERA et al., 2005).

c) Etileno

O hormônio etileno, além de apresentar funções fisiológicas em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, também é conhecido como o hormônio do estresse, visto que a sua síntese é induzida por uma ampla gama de sinais de estresse, tais como seca, temperaturas extremas, ferimento mecânico ou infecção por patógenos. Esse hormônio é sintetizado a partir da metionina via S-adenosilmetionina e 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) (KENDE, 1993). O etileno atua como uma molécula sinalizadora e provoca alterações substanciais na expressão gênica.

Além da modulação da expressão gênica, o etileno também modula outros fitormônios. Em *Arabidopsis*, ele inibe o fechamento dos estômatos induzido por ABA através da inibição da via de sinalização de ABA (TANAKA et al., 2005).

d) Eliminadores de ROS

Durante seu ciclo de vida, as plantas são expostas a uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos, e, o déficit hídrico pode aumentar a produção de ROS, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e OH^-, o que revela um estado de estresse oxidativo, relacionado a danos na membrana das células (ZLATEV et al., 2006). Os radicais superóxido e seu produto reduzido H_2O_2 são componentes potencialmente tóxicos às células, podendo causar danos irreversíveis a macromoléculas. Contudo, também estão envolvidos com a sinalização do estresse e em processos de desenvolvimento das plantas, tais como elongação, divisão e diferenciação celular (COLVILLE; KRANNER, 2010).

Genótipos tolerantes devem não somente ser capazes de reter quantidade suficiente de água em condições de déficit hídrico, como também, terem um sistema de proteção ativo contra as ROS. Mecanismos de detoxificação de ROS existem em todas as plantas e podem ser categorizados como enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxidase, glutationa redutase e monodehidroascorbato redutase) e não-enzimáticos

(flavononas, antocianinas, carotenóides e ácido ascórbico). Sendo assim, a tolerância relativa de genótipos pode ser refletida pelo aumento da atividade dessas enzimas, que atuam como um sistema de controle de danos, fornecendo proteção contra o estresse oxidativo e resultando em menor peroxidação de lipídeos e maior estabilidade de membranas nos genótipos tolerantes (ZLATEV et al., 2006). De fato, um aumento da capacidade metabólica dessas enzimas deve fazer parte de um sistema antioxidante geral nas plantas, envolvendo regulação da síntese de proteínas ou da expressão gênica.

e) Fatores de transcrição *Dehydration Responsive Elements Binding* (*DREB*)

Os fatores de transcrição *DREB* desempenham uma importante função na tolerância a estresses abióticos em plantas. Eles se aderem a sequências de DNA presentes em regiões promotoras de genes expressos durante a desidratação (KASUGA et al., 1999).

O fator de transcrição *GmDREB2* de soja foi isolado e superexpresso em *Arabidopsis thaliana* e tabaco. Sua expressão foi induzida por tratamentos de seca, alta concentração salina, baixas temperaturas e ABA, e o aumento em sua expressão levou a um aumento na expressão de genes já descritos como *downstreams* para o gene *At*DREB1 em *A. thaliana* (CHEN et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores observaram o acúmulo de altos níveis de prolina livre, sugerindo que o *GmDREB2* também ative a expressão de alguns genes envolvidos na biossíntese de prolina.

Os genes *DREB* tipo 1 (*AtDREB1A*, *AtDREB1B* e *AtDREB1C*) estão envolvidos nas vias de resposta ao frio, enquanto os genes *DREB* tipo 2 (*AtDREB2A* e *AtDREB2B*) estão envolvidos principalmente nas vias de resposta osmótica (sal e seca) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Lee et al. (2010) estudaram os efeitos de ABA exógeno e várias condições estressantes sobre a expressão de *DREB2C*, através de *RT-qPCR*, detectando níveis altos desse fator de transcrição após tratamento salino, e, níveis baixos após aplicação de manitol e indução de frio.

f) Proteínas *Late Embriogenesis Abundant* (*LEA*)

As proteínas *LEA* acumulam-se, tipicamente, durante os estágios tardios de embriogênese ou em resposta à desidratação, baixa temperatura, salinidade ou tratamento com ABA, o que indica que são proteínas responsivas à desidratação celular (RAMANJULU; BARTELS, 2002). Colmenero-Flores et al. (1997) descreveram o gene *Pvlea-18*, mostrando a

sua acumulação em tecidos vegetais sob estresse hídrico. Shao, Liang e Shao (2005) também mostraram o envolvimento de proteínas *LEA* na tolerância à seca, à salinidade e ao frio.

Cabe ressaltar que essas proteínas apresentam funções relacionadas com sequestro de íons, proteção de membranas, dobramento de proteínas (chaperonas) e retenção de água (BRAY, 1993; DURE, 1993; ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997).

g) Aquaporinas

A capacidade de transportar água através de membranas é imprescindível para o ajuste osmótico sob condições de escassez de água (PENG et al., 2007). O movimento de água através das membranas celulares é regulado por uma família de proteínas, altamente conservada, denominada "*major intrinsic proteins*" (MIP) ou simplesmente, aquaporinas, as quais formam canais para a passagem de água através das membranas celulares.

As aquaporinas de plantas são divididas em quatro grupos ou clados, baseados na similaridade das suas sequências de aminoácidos, em: (i) proteínas intrínsecas à membrana plasmática (PIPs); (ii) proteínas intrínsecas ao tonoplasto (TIPs); (iii) proteínas intrínsecas a nodulinas (NIPs); (iv) pequenas proteínas básicas intrínsecas (SIPs) (QUIGLEY et al., 2001; LUU; MAUREL, 2005). Essas proteínas são necessárias às plantas em diferentes membranas, tecidos, em um padrão complexo ou em tempos diferentes dependendo das condições ambientais.

Há evidências recentes de que as PIPs apresentam uma função direta nas relações de água nas plantas e tem se mostrado envolvidas na tolerância ao estresse hídrico (PENG et al., 2007). E, as TIPs apresentam importância no processo de expansão celular rápida, pois como se sabe, o vacúolo central pode ocupar até 90% do volume das células de uma planta adulta, funcionando como um compartimento de estoque, com funções na regulação do turgor, sinalização celular e degradação. A biogênese do vacúolo e seu crescimento requerem o transporte de substâncias osmoticamente ativas através do tonoplasto, seguida de um rápido influxo de água para dentro do vacúolo. Esse influxo gera uma pressão de turgor que direciona a expansão celular e mantêm a forma da célula. Dessa forma, uma expansão celular rápida pode requerer uma elevada permeabilidade hidráulica do tonoplasto para suportar a entrada de água dentro do vacúolo e envolve as aquaporinas do grupo TIP (JAVOT; MAUREL, 2002).

É importante que se diga que há dois pontos de vista opostos, no que se refere à fisiologia das aquaporinas, em plantas sob déficit hídrico. Um dos pontos de vista é que o aumento nos níveis de aquaporinas fornece à planta a habilidade de lidar com a seca, o que se

baseia na observação de que algumas aquaporinas são induzidas ou ativadas sob esse tipo de estresse (LIAN et al., 2004). O outro ponto de vista defende que as plantas evitam a perda excessiva de água, reprimindo as aquaporinas durante a desidratação (HACHEZ et al., 2006).

h) Proteínas de choque térmico (da sigla em inglês, HSPs)

Como o nome sugere, elas foram identificadas pela primeira vez como ativadas em resposta ao calor. As HSPs são altamente conservadas e têm sido descritas diversas classes dessas proteínas. Os membros da família HSP70 previnem a agregação e auxiliam no dobramento (maturação) de proteínas sob condições de estresse, e, também estão envolvidos nos processos de importação, translocação e facilitação da degradação proteolítica de proteínas instáveis através da marcação dessas proteínas para serem transportadas aos lisossomos ou proteossomos (WANG et al., 2004; XU; HUANG, 2010).

As HSPs são encontradas em plantas submetidas ao déficit hídrico (JOSHI; NGUYEN, 1996) e sua expressão tem sido detectada através de microarranjos de cDNA (SEKI et al., 2002; OONO et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2004). Esses estudos ainda mostram que as HSPs contribuem para a tolerância à seca das plantas.

i) Carboidratos

Os estresses abióticos provocam grandes alterações, qualitativas e quantitativas, nos carboidratos ou açúcares presentes nas células vegetais, afetando a expressão de um grande número de genes que podem ter a sua expressão diminuída ou aumentada (GUPTA; KAUR, 2005). O transporte de carboidratos é de extrema importância, visto que essas substâncias atuam como sinalizadoras em plantas. Muitos genes envolvidos com a fotossíntese, com o metabolismo de carbono e nitrogênio e com as respostas a estresses, incluindo genes induzidos por ABA são regulados no nível transcricional por açúcares (ROLLAND; MOOR; SHEEN, 2002). Segundo Couée et al. (2006), a acumulação de açúcares solúveis regula negativamente a fotossíntese, incluindo a expressão de genes do Ciclo de Calvin.

Além disso, açúcares como a rafinose e a sacarose são importantes na proteção das células sob déficit hídrico, atuando como solutos disponíveis para osmorregulação ou como protetores de macromoléculas e membranas (LEOPOLD, 1990; BRAY, 1997; TAJI et al., 2002). A trehalose também está presente em uma ampla variedade de organismos (ELBEIN et al., 2003) e desempenha uma importante função na regulação metabólica e na tolerância a estresses abióticos nesses organismos (LI et al., 2011).

Sendo assim, pode-se afirmar que a sobrevivência de células sob déficit hídrico está condicionada a um aumento no aporte de açúcares. De fato, a seca provoca um aumento na quantidade de sacarose em folhas de feijoeiro (STEWART, 1971) e a enzima α-amilase é induzida pelo déficit hídrico em folhas de cevada (JACOBSEN; HANSON; CHANDLER, 1986). Bewley e Black (1994) observaram que lipídeos de reserva são ativamente metabolizados a sacarose através do processo de gliconeogênese e a sacarose produzida é transportada às regiões de crescimento das plantas. Cabe lembrar que a sacarose é o substrato primário para a síntese de amido (DUFFUS; DUFFUS, 1984). Então, o conteúdo de amido aumenta em condições onde a concentração de sacarose aumenta (NAKAMURA et al., 1991), ou seja, quando a planta é exposta a déficit hídrico, por exemplo.

j) Prolina

O acúmulo de prolina em células vegetais submetidas a déficit hídrico tem sido sugerido como um mecanismo de ajuste osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993), podendo também ter função na estabilização de estruturas subcelulares, no depósito de energia, como componentes de cascatas de sinalização molecular do estresse e na constituição da parede celular das plantas, visto que é um dos seus constituintes principais (NEPOMUCENO et al., 2001).

O metabolismo de prolina é aumentado sob estresse osmótico, enquanto seu catabolismo é reprimido (KAVI KISHOR et al., 2005). Sua acumulação parece ser mediada tanto pela via de sinalização ABA-dependente quanto pela ABA-independente (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999). Além de sua função como soluto compatível, também é sugerido que a prolina reduza a desnaturação de proteínas, preservando, dessa forma, a estrutura e a atividade de enzimas (SAMUEL et al., 2000), e servindo como fonte de carbono, nitrogênio e energia durante a recuperação do estresse (HAMILTON; HECKATHORN, 2001).

k) Polióis

Em plantas, os polióis são geralmente representados por: manitol, sorbitol, galactinol, mioinositol e pinitol. Cabe destacar que a rafinose é formada a partir de galactinol e sacarose.

Os polióis têm sua síntese aumentada sob déficit hídrico em muitas espécies de plantas e sugere-se que tenham um efeito osmótico (TAJI et al., 2002). O galactinol desempenha proteção contra radicais hidroxila, *in vitro,* sendo assim, pode proteger as células vegetais do

dano oxidativo (NISHIZAWA; YABUTA; SHIGEOKA, 2008). O manitol também tem apresentado ação eliminadora de radicais hidroxila, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SHEN; JENSEN; BOHNERT, 1997).

l) Poliaminas

As poliaminas são pequenos componentes orgânicos com dois ou mais grupos amino primários, encontrados em todas as células eucarióticas. Putrescina, espermidina e espermina são as principais poliaminas encontradas em plantas e estão envolvidas com os processos de proliferação celular, crescimento, morfogênese, diferenciação e morte celular programada (YAMAGUCHI et al., 2006).

Sob déficit hídrico, ocorre a acumulação de putrescina, espermidina, espermina e cadaverina em muitas espécies de plantas. Além de seu possível efeito no ajuste osmótico, as poliaminas também estão envolvidas no fechamento dos estômatos, através da regulação dos canais de K^+ na membrana plasmática das células-guarda (LIU; ZHANG; SHOUYI, 2000). Adicionalmente, as poliaminas são componentes do sistema antioxidante celular e atuam na eliminação de radicais hidroxila (KUZNETSOV et al., 2007).

m) Genes *MADS Box*

Os genes *MADS Box*, foram inicialmente identificados como genes homeóticos florais, codificando para uma família de fatores de transcrição que estão envolvidos em funções diversas nas plantas. Também já foram reportados como superexpressos durante o desenvolvimento de sementes em condições de estresse (frio, seca e sal) em arroz (ARORA et al., 2007). Além disso, as proteínas *MADS Box* de leveduras ativam genes requeridos para a integridade da parede celular e para as respostas ao estresse osmótico (JUNG; LEVIN, 1999).

n) Genes aldeído desidrogenase (da sigla em inglês, ALDH)

O efeito deletério do estresse osmótico é frequentemente causado pela acumulação de moléculas reativas como os aldeídos. Essas moléculas podem causar a peroxidação de lipídeos e modificações nas proteínas e nos ácidos nucleicos. Contudo, os aldeídos podem ser convertidos em ácidos carboxílicos não-tóxicos por diferentes tipos de enzimas ALDH, as quais ocorrem em todos os organismos vivos, o que demonstra a sua importância. Contudo, é importante notar que os aldeídos não devem ser vistos somente como moléculas tóxicas, uma vez que são produtos intermediários na síntese de osmólitos, que atuam como moléculas

protetoras quando a célula está sob estresse osmótico. Por esse motivo, um cuidadoso balanço de aldeídos é requerido e há evidências de que as enzimas ALDH estão envolvidas na manutenção desse balanço (KOTCHONI; BARTELS, 2003).

A superexpressão dos genes *ALDH* sob condições de salinidade ou seca tem sido descrita em muitas espécies de plantas, indicando que as enzimas correspondentes podem desempenhar uma função essencial durante a adaptação da planta ao estresse osmótico (KOTCHONI; BARTELS, 2003).

o) Ubiquitina

A ubiquitina é uma proteína que apresenta como principal função etiquetar proteínas que serão destinadas à degradação. Assim, sua expressão é comumente observada durante o déficit hídrico (ZHU; HASEGAWA; BRESSAN, 1997), visto que a degradação de proteínas é alta durante a desidratação celular, devido ao aumento da atuação dos sistemas de reparo durante as situações de estresse.

Diante do que foi exposto, é imprescindível a identificação de um número cada vez maior de genes que possam ser utilizados no melhoramento genético ou na transformação genética do feijoeiro comum para aumentar a sua tolerância a estresses abióticos.

2.5 Melhoramento genético visando tolerância ao déficit hídrico

Como a seca é o principal estresse abiótico que contribui para a redução do rendimento do feijoeiro comum em todo o mundo e há perspectivas de que ocorra um aumento da escassez de água no futuro, a adaptação ao déficit hídrico, vem se tornando um dos maiores objetivos dos programas de melhoramento genético dessa cultura agrícola atualmente. Contudo, o melhoramento genético para tolerância à seca é um processo lento e difícil (SUBBARAO et al., 1995), pois, geralmente, múltiplas variáveis estão envolvidas, influenciando o desempenho da cultura sob seca (SINCLAIR; PURCELL, 2005). Muitos caracteres de adaptação à seca tais como tamanho e profundidade das raízes, condutividade hidráulica e acumulação de reservas, estão associados com o desenvolvimento e a estrutura das plantas e são mais constitutivos do que induzidos por estresse (CHAVES; MAROCO;

PEREIRA, 2003). Além disso, a fertilidade dos solos tropicais é frequentemente muito baixa, especialmente no que se refere à disponibilidade de fósforo, o que pode limitar o desenvolvimento das raízes (THUNG; RAO, 1999). A baixa fertilidade dos solos, de modo geral, ocorre juntamente com condições de déficit hídrico, porém, combinar a tolerância a essas duas condições representa um grande desafio aos programas de melhoramento.

Do ponto de vista prático, é muito difícil a imposição de déficit hídrico, de forma controlada e reprodutível, a grandes populações de plantas em programas de melhoramento. E, tradicionalmente, monitoramentos abrangentes do desenvolvimento das plantas e de parâmetros fisiológicos não são utilizados no processo de seleção de plantas em ambientes com déficit hídrico, preferindo-se na maioria das vezes, selecionar as plantas que apresentam maior rendimento.

Cabe ressaltar que há diferenças genéticas entre os genótipos de feijoeiro comum para adaptação ao déficit hídrico (MUÑOZ-PEREA et al., 2006), as quais tem sido exploradas pelo melhoramento genético (BEEBE et al., 2008). A tolerância à seca pode vir de qualquer um dos dois *pools* gênicos reconhecidos (mesoamericano ou andino). Porém, os mesoamericanos da raça Durango e da raça Mesoamerica, são as fontes mais importantes de genes de adaptação à seca (MIKLAS et al., 2006).

Dentre as estratégias que aumentam a adaptação à seca em feijoeiro comum, está incluído o desenvolvimento de um sistema radicular profundo e balanceado, o qual aumenta a extração de solução do solo em profundidades maiores (TURNER, 1979; WHITE; CASTILLO, 1992; ASFAW; BLAIR, 2012). Outra estratégia inclui a maximização do uso da água para o crescimento e a produção de sementes através de uma maior mobilização de fotoassimilados das estruturas vegetais para as sementes (RAO, 2001).

A captação eficiente da água do solo depende do tamanho das raízes (comprimento ou massa), atividade e distribuição espacial (HUANG; GAO, 2000). Contudo, a seca reduz o crescimento e o desenvolvimento radicular e pode ser a principal causa da morte das raízes no campo. Além disso, um sistema radicular reduzido, sob déficit hídrico severo, pode agravar a suscetibilidade das plantas aos insetos (MUÑOZ-PEREA et al., 2006), enquanto que um sistema radicular bem desenvolvido e saudável ajuda a manter o status hídrico da planta, estabilizando a produtividade, mesmo sob seca (KAMOSHITA et al., 2008). É importante ressaltar que o genótipo mesoamericano BAT 477, o qual foi identificado pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), é tolerante à seca, e apresenta um sistema radicular profundo (WHITE et al., 1994), com grande eficiência de absorção de água (GUIMARÃES; BRUNINI; STONE, 1996).

O controle genético das características das raízes, que determinam a adaptação à seca no feijoeiro comum, é governado pelo genótipo do sistema radicular (WHITE; CASTILLO, 1989). E, apesar das características das raízes serem reconhecidamente importantes para a adaptação ao déficit hídrico, a interação com diferentes tipos de solo, torna a observação das raízes difícil. Portanto, a seleção de plantas tolerantes à seca, usando a análise de marcadores moleculares, abriu novas portas para a aplicação da seleção assistida por marcadores para caracteres relacionados às raízes, tais como tolerância à seca, os quais são difíceis e demorados de serem avaliados fenotipicamente (ASFAW; BLAIR, 2012).

Dessa forma, torna-se de extrema importância a integração entre técnicas moleculares de análise genética e técnicas convencionais de melhoramento. A primeira fornecendo ferramentas para a realização de uma pré-seleção de genótipos que expressem os genes de interesse, e a segunda testando esses genótipos em campo e observando as interações genótipo vs ambiente a fim de obter cultivares adequadas a cada região e a cada condição edafoclimática.

2.6 Técnicas utilizadas para o estudo da expressão gênica

Expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene é processada em um produto gênico funcional, ou seja, a proteína. A transcrição é o início da expressão gênica. Durante esse período, os fatores de transcrição, combinados com os genes-alvo, controlam a expressão de uma série de genes relacionados.

Vários passos no processo de expressão gênica podem ser modulados, incluindo a transcrição do mRNA e a modificação pós-traducional de uma proteína. A fosforilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais importantes e tem se mostrado um processo dinâmico de regulação biológica. A fosforilação e a desfosforilação são dois processos-chave de regulação da expressão, e é possível que mudanças no ambiente em que a planta se desenvolve possam induzir a fosforilação de proteínas, levando a alterações na quantidade e no tipo de proteína sintetizada (GUO et al., 2011). Assim, a regulação gênica dá à célula o controle sobre sua estrutura e função, e é a base para a diferenciação celular, morfogênese e para a versatilidade e adaptabilidade de qualquer organismo.

As técnicas moleculares têm fornecido novas informações aos programas de melhoramento, o que tem mudado a escala de análise de genes e de seus níveis de expressão. Técnicas da genômica, transcritômica e proteômica já têm sido aplicadas no estudo do feijoeiro, cujo genoma já está disponível publicamente na plataforma *Phytozome* (*http://www.phytozome.net*).

Além da PCR Quantitativa em Tempo Real (da sigla em inglês, *RT-qPCR*), as técnicas para o estudo da expressão gênica mais utilizadas são o *Differential Display* (*DD*) (LIANG; PARDEE, 1992), a *Serial Analysis of Gene Expression* (*SAGE*) (VELCULESCU et al., 1995), a *Suppression subtractive library* (*SSH*), (DIATCHENKO et al., 1996), a técnica de *cDNA-AFLP* (BACHEM et al., 1996) e os microarranjos (FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). Todas estas técnicas permitem a identificação de genes diferencialmente expressos entre tratamentos, estágios de desenvolvimento, órgãos, ou genótipos.

Quando são utilizados os microarranjos, somente sequências já conhecidas podem ser analisadas. O *SAGE* é mais comumente utilizado para traçar perfis transcricionais globais. A *SSH* tem a desvantagem de requerer grande quantidade de material biológico. Já os métodos *DD* e *cDNA-AFLP* requerem uma menor quantidade de material biológico e, portanto, são preferíveis. Porém, no método *DD*, o cDNA é amplificado usando um iniciador *poli-dT* e oligonucleotídeos arbitrários para o iniciador 5', o que em plantas, resulta em fragmentos de DNA com preponderância de sequências 3' não-traduzíveis, o que dificulta a pesquisa em bancos de dados. Por sua vez, o método de análise transcricional global por meio da técnica de *cDNA-AFLP* é uma tecnologia apropriada para estudos de expressão gênica em espécies não-modelo, pois não requer dados prévios da sequência e possibilita a identificação visual de transcritos diferencialmente expressos (SHI et al., 2011).

A técnica de *cDNA-AFLP* está entre as poucas escolhas disponíveis que podem ser usadas no nível transcritômico para identificar genes previamente desconhecidos que tenham padrões de expressão de interesse (BREYNE; ZABEAU, 2001). Outra vantagem é a sua elevada sensibilidade, isto é, a habilidade de detectar transcritos de baixa abundância (FUKUMURA et al., 2003), o que é difícil de ser obtido utilizando a técnica de microarranjos (EVANS et al., 2002). Na técnica de *cDNA-AFLP*, diferenças de intensidade de bandas no gel refletem as diferenças relativas nos níveis de expressão dos genes (SHI et al., 2011). E ainda, as bandas de interesse podem ser sequenciadas e, dessa forma, novos genes relevantes para o processo biológico em estudo podem ser encontrados.

Dessa forma, essa técnica possibilita o estudo da expressão dinâmica de um gene sob diferentes condições, enquanto também propicia o estudo da expressão gênica diferencial de muitos genes submetidos às mesmas condições, ou seja, fornece um método viável para o estudo dos padrões de expressão de genes envolvidos em mecanismos de tolerância a estresses (POLEGRI et al., 2010). Além disso, o *cDNA-AFLP* apresenta diversas vantagens, tais como: poucos falso-positivos, alta reprodutibilidade, informação precisa da expressão gênica e acesso a informações de transcritomas em larga escala (GUO et al., 2011; BACHEM et al., 1996). Contudo, também apresenta algumas desvantagens: exige muito tempo, é uma técnica cara e muito sensível à qualidade e à pureza do RNA utilizado. Contudo, essas desvantagens são aceitáveis quando comparadas com as vantagens que essa técnica traz (GUO et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; KOHASHI-SHIBATA, V. Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.20, n. 2, p. 81-93, 1989.

ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; ADAMS, M.W. Plant traits and yield stability of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under drought stress. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 213-219, 1991.

ARORA, R.; AGARWAL, P.; RAY, S.; SINGH, A. K.; SINGH, V. P.; TYAGI, A. K.; KAPOOR, S. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. **BioMed Central Genomics**, London, v. 8, n. 7, p. 242, 2007.

ASFAW, A.; BLAIR, M. W. Quantitative trait loci for rooting pattern traits of common beans grown under drought stress versus non-stress conditions. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 30, n. 3, p. 681-695, 2012.

BACHEM, C.W.B.; VAN DER HOEVEN, R.S.; DE BRUIJN, S.M.; VREUGDENHILL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, G.F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 745-753, 1996.

BARTELS, D. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in plants. In: STOREY, K.B. (Ed.). **Molecular mechanisms of metabolic arrest**: life in limbo. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2001. p. 187-196.

BEEBE, S.; RAO, I.M.; CAJIAO, C.; GRAJALES, M. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 2, p. 582-592, 2008.

BEEBE, S.E.; RAO, I.M.; BLAIR, M.W.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A. Phenotyping common beans for adaptation to drought. In: RIBAUT, J.M.; MONNEVEUX, P. (Ed.). **Drought phenotyping in crops**: from theory to practice. Texcoco: Generation Challenge Programme, 2011. p. 311-334.

BEEBE, S.; SKROCH, P. W.; TOHME, J.; DUQUE, M. C.; PEDRAZA, F.; NIENHUIS, J. Structure of genetic diversity among common beans landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 264-273, 2000.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 460 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Perfil do feijão no Brasil.** Brasília, DF. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>. Acesso em: 26 fev. 2013.

BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n.4, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 48-54, 1997.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004.

BREYNE, P.; ZABEAU, M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 2, p. 136-142, 2001.

BROUGHTON, W.J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.

CANCI, H.; TOKER, C. Evaluation of yield criteria for drought and heat resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, v. 195, n. 1, p. 47-54, 2009.

CARDINALE, F.; MESKIENE, I.; OUAKED, F.; HIRT, H. Convergence and divergence of stress induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, n. 3, p. 703-711, 2002.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, M.; WANG, Q.Y.; CHENG, X.G.; XU, Z.S.; LI, C.L.; YE, X.G.; XIA, L.Q.; MA, Y.Z. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, confered drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2009.

COLMENERO-FLORES, J.M.; CAMPOS, F.; GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A.A. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant protein. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 4, p. 393-405, 1997.

COLVILLE, L.; KRANNER, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 241-255, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, 5º levantamento safra 2012/2013. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_02_08_17_24_51_boletim_fevereiro_2013.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2013.

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 449-459, 2006.

DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* in northwestern South America. **Economic Botany**, New York, v. 47, n. 4, p. 408-423, 1993.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 215-223, 1993.

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, DC, v. 93, n. 12, p. 6025–6030, 1996.

DUAN, K.; YANG, H.; RAN, K.; YOU, S.; ZHAO, H.; JIANG, Q. Characterization of a novel stress-response member of the MAPK family in *Malus hupehensis* Rehd. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 69-78, 2009.

DUFFUS, C.M.; DUFFUS, J.H. **Carbohydrate metabolism in plants.** London: Longman, 1984. 183 p.

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

ELBEIN, A.D.; PAN, Y.T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 17R-27R, 2003.

EVANS, S. J.; DATSON, N. A.; KABBAJ, M.; THOMPSON, R. C.; VREUGDENHIL, E.; DE KLOET, E. R.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Evaluation of Affymetrix gene chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 409-413, 2002.

FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **BioTechniques**, Natick, v. 29, n. 5, p. 1042-1055, 2000.

FUKUMURA, R.; TAKAHASHI, H.; SAITO, T.; TSUTSUMI, Y.; FUJIMORI, A.; SATO, S.; TATSUMI, K.; ARAKI, R.; ABE, M. A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 16, p. e94, 2003.

EMBRAPA. **Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais**. Santo Antonio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. (Sistemas de Produção, 6). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/ FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/index.htm>. Acesso em: 03 fev. 2011.

GUIMARÃES, C.M.; BRUNINI, O.; STONE, L.F. Adaptação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a seca. I. Densidade e eficiência radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 6, p. 393-399, 1996.

GUO, L.; WANG, D.; MA, H.; YIN, W.; XIA, X. Complementary DNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP-cDNA) analysis of differential gene expression from the xerophytes *Ammopiptanthus mongolicus* in response to cold, drought and cold together with drought. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, Lagos, v. 10, n. 19, p. 3715-3725, 2011.

GUPTA, A.K.; KAUR, N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 30, n.5, p. 761-776, 2005.

HACHEZ, C.; ZELAZNY, E.; CHAUMONT, F. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, n. 8, p. 1142-1156, 2006.

HAMILTON, E.W.; HECKATHORN, S.A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 3, p. 1266-1274, 2001.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 333, p. 413-434, 1999.

HUANG, B.; GAO, H. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 196-203, 2000.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 377-403, 1996.

JACOBSEN, J.V.; HANSON, A.D.; CHANDLER, P.C. Water stress enhances expression of an α-amylase gene in barley leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 80, n. 2, p. 350-359, 1986.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 301-313, 2002.

JONES, P.G.; THORNTON, P.K. The potential impacts of climate change on maize production in Africa and Latin America in 2055. **Global Environmental Change**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 51-59, 2003.

JOSHI, C.P.; NGUYEN, H.T. Differential display-mediated rapid identification of different members of a multigene family, HSP16.9 in wheat. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 575-584, 1996.

JUNG, U. S.; LEVIN, D. E. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signaling pathway. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 1049-1057, 1999.

KAMOSHITA, A.; BABU, R.C.; MANIKANDA BOOPATHI, N.; FUKAI, S. Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 1-23, 2008.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 3, p. 287-291, 1999.

KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; SRI LAXMI, R.N.; NAIDU, K.R.; RAO, S.; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n.3, p. 424-438, 2005.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 283-307, 1993.

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

KOTCHONI, S.O.; BARTELS, D. Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenases as an example. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, special issue, p. 37-51, 2003.

KUMAR, J.; PRATAP, A.; SOLANKI, R.K.; GUPTA, D.S.; GOYAL, A.; CHATURVEDI, S.K.; NADARAJAN, N.; KUMAR, S. Genomic resources for improving food legume crops. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 150, n. 3, p. 289-318, 2012.

KUZNETSOV, V.; SHORINA, M.; ARONOVA, E.; STETSENKO, L.; RAKITIN, V.; SHEVYAKOVA, N. NaCl and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 363-370, 2007.

LEE, S.-J.; KANG, J.-Y.; PARK, H.-J.; KIM, M.D.; BAE, M.S.; CHOI, H.-I.; KIM, S.Y. *DREB2C* interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 716-727, 2010.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, R.G.; CUMMING, J.R. (Ed.). **Stress response in plants**: adaptation and acclimation mechanisms. New York: Wiley-Liss, 1990. 407 p.

LI, Y.; LEE, K.K.; WALSH, S.; SMITH, C.; HADINGHAM, S.; SOREFAN, K.; CAWLEY, G.; BEVAN, M.W. Establishing glucose- and ABA- regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. **Genome Research**, Woodbury, v. 16, n. 3, p. 414-427, 2006.

LI, H-W.; ZANG, B-S.; DENG, X-W.; WANG, X-P. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. **Planta**, Berlin, v. 234, n. 5, p. 1007-1018, 2011.

LIAN, H.L.; YU, X.; YE, Q.; DING, X.; KITAGAWA, Y.; KWAK, S.; SU, W.; TANG, Z. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, n. 4, p. 481-489, 2004.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, DC, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LIU, Q.; ZHANG, Y.; SHOUYI, C. Plant protein kinase genes induced by drought, high salt and cold stresses. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 45, n. 13, p. 1153-1157, 2000.

LUU, D. T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2005.

MANO, J. Early events in environmental stresses in plants – induction mechanisms of oxidative stress. In: INZE, D.; MONTAGO, M.V. (Ed.). **Oxidative stress in plants.** New York: Taylor and Francis, 2002. p. 217-245.

MARTINS-JÚNIOR, R. R.; OLIVEIRA, M. S. C. ; BACCACHE, M. A.; PAULA, F. M. Effects of water deficit and rehydration on the polar lipid and membranes resistance leaves of *Phaseolus vulgaris* L. cv. pérola. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 2, p. 361-367, 2008.

MASAYA, P.; WHITE, J.W. Adaptation to photoperiod and temperature. In: SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans**: research for crop improvement. Cali: CIAT, 1991. p. 445-500.

MIKLAS, P.N.; KELLY, J.D.; BEEBE, S.E.; BLAIR, M.W. Common bean breeding from resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 147, n. 1, p. 105-131, 2006.

MONTEIRO DE PAULA, F.; PHAM THI, A.T.; VIEIRA DA SILVA, J.; JUSTIN, A.M.; DEMANDRE, C.; MAZLIAK, P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. **Plant Science**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 185-193, 1990.

MUÑOZ-PEREA, C.G.; TERÁN, H.; ALLEN, R.G.; WRIGHT, J.L.; WESTERMANN, D.T.; SINGH, S.P. Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 9, p. 2111-2120, 2006.

NAKAMURA, K.; OHTA, M.; YOSHIDA, N.; NAKAMURA, K. Sucrose-induced accumulation of β-amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 902-909, 1991.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 165-185, 2005.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; MELFI, D.; IZZO, R. Lipid composition of plasma membrane isolated from sunflower seedlings grown under water-stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 4, p. 508-514, 1993.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas - Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 23, p. 12-18, 2001.

NIELSEN, D.C.; NELSON, N. Black bean sensitivity to water stress at various growth stages. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 2, p. 422-427, 1998.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 3, p. 1251-1263, 2008.

OBLESSUC, P.R.; BORGES, A.; CHOWDHURY, B.; CALDAS, D.G.G.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A.; MELOTTO, M. Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PLOS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43161, 2012.

OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K.; SATOH, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using 7000 full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 868-887, 2003.

PENG, Y.; LIN, W.; CAI, W.; ARORA, R. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimatation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 3, p. 729-740, 2007.

PIMENTEL, C.; JACOB, J.; GOI, S.R.; PESSANHA, G.G. Estresse hídrico em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em simbiose com o *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Turrialba**, Turrialba, v. 40, n. 4, p. 520-526, 1990.

PINHERO, R.G.; RAO, M.V.; PALYATH, G.; MURR, D.P.; FLETCHER, R.A. Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 2, p. 695-704, 1997.

PITZSCHKE, A.; HIRT, H. Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 2, p. 606-615, 2009.

POLEGRI, L.; ORNELLA, C.; ARCIONI, S.; PUPILLI, F. Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1869-1883, 2010.

QUIGLEY, F.; ROSENBERG, J.M.; SHACHAR-HILL, Y.; BOHNERT, H. J. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. **Genome Biology**, London, v. 3, n.1, p. 1-17, 2001.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation- induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 25, n. 2, p. 141-151, 2002.

RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J.D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, Wageningen, v. 99, n. 2, p. 127-136, 1998.

RAO, I.M. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop physiology.** New York: Marcel Dekker, 2001. p. 583-613.

RIERA, M.; VALON, C.; FENZ, F.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signaling components. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 123, n. 2, p. 111-119, 2005.

ROLLAND, F.; MOOR, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signalling in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, n. suppl 1, p. S185-S205, 2002.

SAMUEL, D.; KUMAR, T.K.; GANESH, G.; JAYARAMAN, G.; YANG, P.W.; CHANG, M.M.; TRIVEDI, V.D.; WANG, S.L.; HWANG, K.C.; CHANG, D.K.; YU, C. Proline inhibits aggregation during protein refolding. **Protein Science**, New York, v. 9, n. 2, p. 344-352, 2000.

SANTOS, M.G.; RIBEIRO, R.V.; OLIVEIRA, R.F.; PIMENTEL, C. Gas exchange and yield response to foliar phosphorus application in *Phaseolus vulgaris* L. under drought. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 171-179, 2004.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, Oxford, v.31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. N_2 fixation response to drought in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 229-234, 1998.

SHAO, H.B.; LIANG, Z.S.; SHAO, M.A. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 131-135, 2005.

SHARMA, H.C.; CLEMENT, S.L.; RINDSDILL-SMITH, T.J.; RANGA RAO, G.V.; EL BOUHSSINI, M.; UJAGIR, R.; SRIVASTAVA, C.P.; MILES, M. Insect pest management in food legumes, the future strategies. In: INTERNATIONAL FOOD LEGUMES RESEARCH CONFERENCE, 4., 2005, New Delhi. **Proceedings…** New Delhi: ICRISAT, 2005. p. 522-544.

SHEN, B.; JENSEN, R.G.; BOHNERT, H.J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 4, p. 1177-1183, 1997.

SHI, C.; CHAUDHARY, S.; YU, K.; PARK, S.J.; NAVABI, A.; MCCLEAN, P.E. Identification of candidate genes associated with CBB resistance in common bean HR45 (*Phaseolus vulgaris* L.) using cDNA-AFLP. **Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 75-81, 2011.

SHIMON, G.; GAZALAH, S.; MARIEJEANNE, C.; TALEB, H.; MIZIED, F.N.; INBAL, Y.; CHEN, D.; MICHAL, B. Large-scale identification of leaf senescence associated genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 629-642, 2003.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E.S. Cell signalling and gene regulation: Global analysis of signal transduction and gene expression profiles. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 5, p. 405-409, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 217-223, 2000.

SIEMENS, J.A.; ZWIAZEK, J.J. Changes in root water flow properties of solutions culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under different intensities of water-deficit stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 1, p. 44-49, 2004.

SINCLAIR, T.R.; PURCELL, L.C. Is a physiological perspective relevant in a 'genocentric' age? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 421, p. 2777-2782, 2005.

SORATTO, R.P.; ORIVALDO, A.R.F.; RODRIGUES, R.A.F.; BUZETTI, S.; SILVA, T.R.B. Resposta do feijoeiro ao preparo do solo, manejo de água e parcelamento do nitrogênio. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 89-96, 2003.

STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1531-1542, 2000.

STEWART, C. R. Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, n. 6, p. 792-794, 1971.

SUBBARAO, G.V.; JOHANSEN, C.; SLINKHARD, A.E.; NAGESWARA RAO, R.C.; SAXENA, N.P.; CHAUHAN, Y.S. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 6, p. 469-523, 1995.

TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOSAKI, K.; SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n.4, p. 417-426, 2002.

TAKAHASHI, S.; SEKI, M.; ISHIDA, J.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; NARUSAKA, M.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; AKIYAMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 29-55, 2004.

TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJAMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 4, p. 2337-2343, 2005.

THOMAS, T.L.; VIVEKANANDA, J.; BOGUE, M.A. ABA regulation of gene expression in embryos and mature plants. In: DAVIES, W.J.; JONES, H.G. (Ed.). **Abscisic acid**: physiology and biochemistry. Lancaster: Bios Scientific Publishers, 1991. p. 125-135.

THUNG, M.; RAO, I.M. Integrated management of abiotic stresses. In: SINGH, S.P. (Ed.). **Common bean improvement in the twenty-first century.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 331-370.

TURNER, N.C. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: MUSSELL, H.; STAPLES, R.C. (Ed.). **Stress physiology in crop plants.** New York: Wiley Interscience, 1979. p. 343-372.

VANDELEUR, R.; NIEMITZ, C.; TILBROOK, J.; TYERMAN, S. D. Roles of aquaporins in root responses to irrigation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1, p. 141-161, 2005.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, DC, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 244-253, 2004.

WHITE, J.; CASTILLO, J.A. Relative effect of root and shoot genotypes on yield of common bean under drought stress. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 2, p. 360-362, 1989.

WHITE, J.W.; CASTILLO, J.A. Evaluation of diverse shoot genotypes on selected root genotypes of common bean under soil water deficits. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 3, p. 762-765, 1992.

WHITE, J.W.; CASTILLO, J.A.; EHLERINGER, J.R.; GARCIA, J.A.; SINGH, S.P. Relations of carbon isotope discrimination and other physiological traits to yield in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under rainfed conditions. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 275-284, 1994.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

XU, C.; HUANG, B. Comparative analysis of drought responsive proteins in Kentucky bluegrass cultivars contrasting in drought tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2543-2552, 2010.

YAMAGUCHI, K.; TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; IMAI, A.; MIYAZAKI, A.; TAKAHASHI, T.; MICHAEL, A.; KUSANO, T. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 30, p. 6783-6788, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2005.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 781-803, 2006.

YU, M.A.; BLISS, F.A. Seed proteins of common bean. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 3, p. 431-437, 1978.

ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.W.; CHEN, H.; HENDERSON, I.R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E. Genomewide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 6, p. 1189-1201, 2006.

ZHU, J.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 16, n. 3, p. 253-277, 1997.

ZLATEV, Z. S.; LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; YORDANOV, I. T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, n. 3, p. 389-394, 2006.

3 IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS SOB DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM

Resumo

A tolerância à seca é um caráter multigênico, sendo assim, genótipos com diferentes graus de tolerância ao déficit hídrico apresentam expressão gênica diferencial, com ativação e/ou repressão de determinados genes. Esse trabalho teve por objetivo identificar transcritos diferencialmente expressos em raízes, caules e folhas de dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante (BAT 477) e outro suscetível (IAC-Carioca 80SH) à seca. Para isso foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, com delineamento experimental em blocos casualizados, sendo induzido o déficit hídrico, por meio da suspensão da irrigação, quando as plantas atingiram o estádio fenológico R_5, mantendo-se sob suprimento hídrico adequado as plantas-controle. Foi então utilizada a técnica de *cDNA-AFLP* para isolar os transcritos diferencialmente expressos entre os dois genótipos, a qual, aliada ao sequenciamento, possibilitou a identificação e anotação de 45 transcritos, sendo 21 (sete nas raízes, oito nos caules e seis nas folhas) preferencialmente expressos no genótipo tolerante e 24 (16 nas raízes, sete nos caules e um nas folhas) preferencialmente expressos no genótipo suscetível. Posteriormente, foram selecionados nove transcritos para realizar a validação da sua expressão por *RT-qPCR*, confirmando a robustez da técnica empregada e dos dados obtidos. Essa abordagem de análise de genótipos com resposta contrastante ao estresse foi útil para revelar as funções dos genes verdadeiramente relevantes para a tolerância ao estresse estudado. Dentre os transcritos identificados no genótipo tolerante, no mínimo 11 apresentam potencial para serem usados em trabalhos futuros de transformação genética, (*chlorophyll A-B binding protein*, *HSP40*, *HSP70*, *glycosyl hydrolase*, *serine/threonine protein kinase*, *trehalose-6-phosphate synthase*, *E3 ubiquitin ligase*, *fructose biphosphate aldolase*, *mediator complex subunit 13*, *aquaporin nodulin MTN-3-related* e *TCP transcription factor*) e no genótipo suscetível, nove (*coatomer protein complex*, *monoamine-oxidase A repressor R1*, *synaptobrevin*, *haloacid dehalogenase-like hydrolase*, *ADP-ribosylation factor*, *mTERF*, *serine protease S1C HtrA-related*, *legume lectin* e *SWI/SNF-related chromatin binding*). A identificação desses transcritos regulados sob a condição de seca é imprescindível, visto que possibilita seu uso futuro em projetos de melhoramento de plantas, através de seleção assistida por marcadores ou de transformação genética, visando à obtenção de plantas tolerantes à seca.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Escassez de água. Eletroforese. PCR em tempo real.

Abstract

Drought tolerance is a multigenic character, so genotypes with different degrees of tolerance to water deficit exhibit differential gene expression, with activation and/or repression of certain genes. This study aimed to identify differentially expressed transcripts in roots, stems and leaves of two common bean genotypes, one tolerant (BAT 477) and other susceptible (IAC-Carioca 80SH) to drought. The experiment was conducted in a green house, with a randomized block design, being a water deficit induced by withholding water when the plants reached growth stage R_5, and maintaining adequate water supply to the control plants. To isolate differentially expressed transcripts between both genotypes, the cDNA-AFLP technique was used, which, together with the sequencing, allowed identification and annotation of 45 transcripts, with 21 (seven in roots, eight in stems and six in leaves) preferentially expressed in the tolerant genotype and 24 (16 in roots, seven in stems and one in leaves) preferentially expressed in the susceptible one. Subsequently, nine transcripts were selected to perform the expression validation, by RT-qPCR, confirming the robustness of the cDNA-AFLP technique and data. This approach contrasting genotypes by stress response was useful in revealing the functions of truly relevant genes to stress tolerance. Among the transcripts identified in the tolerant genotype, at least 11 have potential to be used in future studies of genetic transformation (chlorophyll A-B binding protein, HSP40, HSP70, glycosyl hydrolase, serine/threonine protein kinase, trehalose-6-phosphate synthase, E3 ubiquitin ligase, fructose biphosphate aldolase, mediator complex subunit 13, aquaporin nodulin MTN-3-related and TCP transcription factor) and the susceptible genotype have nine (coatomer protein complex, monoamine-oxidase A repressor R1, synaptobrevin, haloacid dehalogenase-like hydrolase, ADP-ribosylation factor, mTERF, serine protease S1C HtrA-related, legume lectin and SWI/SNF-related chromatin binding). The identification of these transcripts, regulated under drought conditions is essential, since it enables their future use in plant breeding projects through marker-assisted selection or genetic transformation, aiming to produce drought-tolerant plants.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Water deprivation. Electrophoresis. Real-time PCR

3.1 Introdução

A seca é um dos estresses ambientais que mais afeta o crescimento e o rendimento das plantas (GUO et al., 2011), alterando praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e das raízes, causando: redução na expansão celular, na condutância hidráulica estomática e radicular, na fotossíntese e, consequentemente, no acúmulo de matéria seca (SIEMENS; ZWIAZEK; 2004; VANDELEUR et al., 2005). As plantas respondem de forma similar ao estresse abiótico e à senescência, afetando o acúmulo de biomassa, e, dentre os genes que são induzidos durante a senescência das folhas, há muitos cujos níveis dos transcritos acumulam-se tanto sob estresse abiótico, quanto sob estresse biótico (SHIMON et al., 2003).

A tolerância ou suscetibilidade de uma planta a estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, envolvendo a expressão coordenada de vários genes relacionados ao estresse, os quais podem ser classificados em dois grupos. O primeiro grupo se refere a genes que codificam proteínas envolvidas em vias de transdução de sinais, tais como os fatores de transcrição; o segundo grupo codifica proteínas efetoras, tais como as enzimas que atuam como receptoras de moléculas oxidantes ou na síntese de biomoléculas e produção de energia. O estímulo ambiental, incluindo estresse salino e hídrico, é inicialmente sentido pelas proteínas receptoras, as quais estão presumivelmente localizadas na superfície celular, e então, transduzido ao núcleo, para induzir a expressão gênica e para aliviar a citotoxicidade ocasionada pelo sal, levando a respostas fisiológicas adaptativas ou protetoras, como a acumulação de osmólitos, por exemplo. Portanto, a percepção do estresse abiótico e a transdução de sinais são passos críticos para o desenvolvimento de mecanismos de respostas adaptativas, assegurando a sobrevivência e a reprodução de plantas expostas a ambientes adversos (CHINNUSAMY; KAREN; ZHU, 2004).

Embora já tenham sido reportados alguns genes associados com a tolerância à seca em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), por se tratar de um caráter multigênico, é imprescindível que seja descoberto um número cada vez maior de genes associados a essa tolerância, aumentando as possibilidades de uso desses genes candidatos tanto no melhoramento genético dessa espécie, através da realização de cruzamentos controlados e da seleção assistida por marcadores, quanto no melhoramento de outras espécies através de transformação genética. E ainda, o estudo de diferenças entre genótipos contrastantes quanto à

tolerância ao déficit hídrico, nos níveis fisiológico, bioquímico e de expressão gênica, pode produzir informações valiosas sobre importantes mecanismos de tolerância a esse tipo de estresse.

Dentro desse contexto, esse estudo foi conduzido com o intuito de identificar genes que apresentam regulação induzida e/ou reprimida sob déficit hídrico, a fim de compreender melhor os mecanismos de tolerância à seca em feijoeiro comum, além de indicar genes candidatos para uso tanto na seleção assistida por marcadores quanto na transgenia.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal e indução dos genes de tolerância à seca

Nesse estudo foram utilizados dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante ao déficit hídrico - BAT 477 (ACOSTA-DÍAZ et al., 2009) e o outro suscetível - IAC-Carioca 80SH (MONTERO-TAVERA; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE-CÁZARES, 2008). Cabe ressaltar que ambos os genótipos pertencem ao *pool* gênico mesoamericano.

Os dois genótipos foram conduzidos em casa-de-vegetação (Figura 1), sob potencial hídrico normal (ψw = -10 kPa a -40 kPa), até atingirem o estádio fenológico R_5 (Tabela 1), caracterizado pela emissão dos botões florais. Após esse período, 60 plantas foram submetidas a condições de déficit hídrico entre ψ w = -41 kPa a -50 kPa, por meio da suspensão da irrigação, e as outras 60 continuaram a ser irrigadas normalmente (Figura 2). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados.

Foram realizadas cinco coletas temporais (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) com níveis crescentes de déficit hídrico, sendo coletados os três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas), a fim de realizar a extração de RNA total para cada tecido e coleta. Os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos, em *bulks* das três repetições, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a maceração.

Cabe ressaltar que foram aplicadas várias intensidades de déficit hídrico, a fim de acessar eventos de percepção e sinalização do estresse e também para revelar os controles moleculares no desempenho das plantas sob déficit hídrico. As respostas no transcritoma

foram analisadas em raízes, caules e folhas, a fim de obter uma avaliação ampla das respostas e para visualizar uma imagem integrativa das respostas moleculares à seca.

Figura 1 - Experimento conduzido em casa-de-vegetação

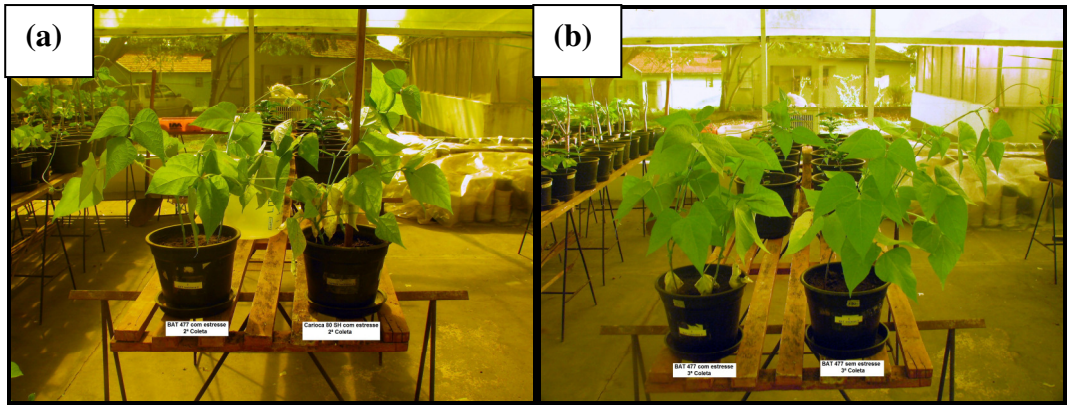

Figura 2 – Plantas no momento da coleta. (a) BAT 477, à esquerda e IAC-Carioca 80SH, à direita, ambos com 48 h de déficit hídrico; (b) BAT 477 com 72 h de déficit hídrico, à esquerda, e com suprimento hídrico adequado, à direita

Tabela 1 - Escala fenológica do feijoeiro comum

Fase	Estádio	Descrição
Vegetativa	V0	Germinação/emergência
	V1	Cotilédones ao nível do solo
	V2	Folhas primárias expandidas
	V3	Primeira folha trifoliada
	V4	Terceira folha trifoliada
Reprodutiva	R5	Botões florais
	R6	Abertura da primeira flor
	R7	Aparecimento das primeiras vagens
	R8	Primeiras vagens cheias
	R9	Modificação da cor das vagens (maturidade fisiológica)

Fonte: Adaptação de Dourado Neto e Fancelli, 2000.

3.2.2 Medição da atividade da catalase

Foi realizada a extração de proteínas totais das folhas de cada genótipo, tanto com 24 h de déficit hídrico, quanto na condição controle, utilizando: 50 mg de tecido vegetal e 1 mL de tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM, DTT 3 mM, EDTA 1mM e PVPP 1% (p/v)). A seguir, foi preparada uma curva-padrão, com diluições seriadas de Albumina de Soro Bovino (da sigla em inglês, BSA) em água ultrapura, usando o Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, realizou-se a quantificação das proteínas, com base na curva-padrão, com leituras de absorbância a 595 nm.

A atividade enzimática da catalase foi estimada, para cada amostra, usando para as leituras de absorbância a 240 nm: 1mL de fosfato de potássio 100mM (pH 7,0), 25 µL de H_2O_2 0,3% e 25 µL de extrato de proteínas totais. Foram realizadas cinco leituras, com intervalos de 15 segundos entre cada uma.

Após a realização dessas leituras foram realizados os seguintes cálculos:

ΔAbs = Leitura Abs 1 – Leitura Abs 5.....(1)

X = ΔAbs/39,4.....(2)

Z = X/1000.....(3)

Y = (Z)/((Prot/(1000/vol))……(4)

em que: Prot = quantificação de proteínas, em mg/mL, baseada na curva-padrão de BSA;
vol = volume de amostra, em µL, utilizado para realizar a quantificação.

Atividade catalase = $Y*10^6$.....(5)

Após a obtenção da atividade da catalase para cada tratamento, foi realizada a análise de variância, a fim de verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos, e, em caso afirmativo, realizou-se o Teste de Tukey a 5% para verificar quais tratamentos tiveram médias estatisticamente diferentes entre si.

3.2.3 Extração de RNA total

A partir das 60 amostras vegetais obtidas (2 genótipos x 3 órgãos vegetais x 2 condições de suprimento hídrico x 5 coletas temporais), foram conduzidas as extrações de RNA total, em triplicata, utilizando o reagente *Trizol®* (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante.

A concentração e a qualidade das amostras de RNA total foram estimadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed*. Além disso, todas as amostras foram tratadas com *DNaseI* (*Fermentas*), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.4 Técnica de cDNA-AFLP

3.2.4.1 Obtenção do cDNA

Nesse trabalho foram utilizadas duas diferentes abordagens, a fim de isolar o maior número possível de transcritos ativados sob a condição de déficit hídrico, sendo que em ambas as abordagens, a síntese de cDNA foi realizada com o kit *SMARTer PCR cDNA Synthesis* (*Clontech Laboratories*), seguindo as recomendações do fabricante.

Na primeira abordagem, foram utilizados os RNAs provenientes dos três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas) coletados 72 horas após o início do déficit hídrico, para cada genótipo. Nesse caso, a síntese de cDNA foi realizada a partir de nove amostras de RNA, como segue: (i) raízes de BAT 477 sob déficit hídrico; (ii) raízes de BAT 477 controle; (iii) caules de BAT 477 sob déficit hídrico; (iv) caules de BAT 477 controle; (v) folhas de BAT 477 sob déficit hídrico; (vi) folhas de BAT 477 controle; (vii) raízes de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico; (viii) caules de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico; (ix) folhas de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico.

Na segunda abordagem, foram preparados *bulks* das amostras de RNA provenientes de cinco coletas temporais, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), para os três órgãos vegetais dos dois genótipos, ambos sob seca. Para a preparação dos *bulks*, utilizou-se 1 µg de RNA por coleta temporal, totalizando 5 µg de RNA por tratamento. Sendo assim, a síntese de cDNA foi realizada a partir de seis *bulks* de RNA, como segue: (i) *Bulk* 1: raízes de BAT 477; (ii) *Bulk* 2: caules de BAT 477; (iii) *Bulk* 3: folhas de BAT 477; (iv) *Bulk* 4: raízes de IAC-Carioca 80 SH; (v) *Bulk* 5: caules de IAC-Carioca 80 SH; (vi) *Bulk* 6: folhas de IAC-Carioca 80 SH.

3.2.4.2 Digestão, pré-amplificação e amplificação seletiva do cDNA

Os cDNAs foram digeridos usando o kit *AFLP CORE* (*Invitrogen*), adicionando 250 ng de cada amostra e seguindo as recomendações do fabricante.

Nas pré-amplificações foram usadas três diferentes combinações de iniciadores: *Eco*RI-A e *Mse*I-0, *Eco*RI-A e *Mse*I-A, *Eco*RI-A e *Mse*I-T. E, nas amplificações seletivas foram usadas seis diferentes combinações de iniciadores: *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0, *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A, *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-0, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-A, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-T (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores usados para as reações de pré-amplificação e amplificação seletiva

Iniciadores	Sequências (5' – 3')
*Eco*RI-A	5' – GACTGCGTACCAATTCA – 3'
*Eco*RI-AAG	5' – GACTGCGTACCAATTCAAG – 3'
*Eco*RI-AGC	5' – GACTGCGTACCAATTCAGC – 3'
*Mse*I-0	5' – GATGAGTCCTGAGTAA – 3'
*Mse*I-A	5' – GATGAGTCCTGAGTAAA – 3'
*Mse*I-T	5' – GATGAGTCCTGAGTAAT – 3'

3.2.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Aos produtos de amplificação seletiva, adicionou-se tampão de carregamento contendo formamida e realizou-se a desnaturação dos mesmos a 94°C por cinco minutos.

Os géis de poliacrilamida a 6% foram preparados com 14 mL de tampão TBE 10X (Tris-borato 890 mM, EDTA 20 mM), 15 mL de água ultrapura, 29,4 g de uréia e 14 mL de acrilamida 30%. O volume foi completado até 70 mL com água ultrapura e foram adicionados 350 µL de persulfato de amônio 10% e 70 µL de TEMED. A solução foi sugada com uma seringa e injetada até atingir o pente. Aproximadamente uma hora após a polimerização, as placas contendo o gel foram colocadas verticalmente dentro da cuba de eletroforese com tampão TBE 1X e foi realizada uma pré-corrida a 55 W por uma hora. As amostras desnaturadas foram aplicadas nos pocinhos do gel e foi realizada a corrida a 40 W por aproximadamente cinco horas.

Após a eletroforese, foi realizada a revelação do gel com nitrato de prata, da seguinte forma: (i) aplicação da solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 1%) no gel, mantendo-o sob agitação por 10 minutos; (ii) lavagem com água destilada por um minuto; (iii) pré-tratamento com ácido nítrico 1,5% por 3 minutos; (iv) lavagem com água destilada por um minuto; (v) aplicação da solução de impregnação (nitrato de prata 0,2%) por 20 minutos; (vi) realização de duas lavagens com água destilada por 30 segundos cada; (vii) aplicação da solução de revelação (30 $g.L^{-1}$ de Na_2CO_3 e 600 µL de formaldeído 37%) até que as bandas aparecessem; (viii) aplicação da solução de bloqueio (ácido acético a 5%) por um minuto; (ix) lavagem com água destilada por um minuto.

3.2.4.4 Sequenciamento dos fragmentos derivados dos transcritos

Os fragmentos derivados dos transcritos (da sigla em inglês, TDFs) detectados nos géis de poliacrilamida como sendo diferencialmente expressos entre os genótipos tolerante e suscetível foram excisados, reamplificados com o mesmo par de iniciadores usado para seu isolamento, purificados e clonados em *Escherichia coli*, usando o vetor *pGEM-TEasy* (*Promega*).

De acordo com Hsu et al. (2008), para cada TDF clonado devem ser selecionadas de 10 a 12 colônias para sequenciamento e deve ser escolhida a sequência mais frequente para categorizar o TDF. Isso deve ser feito porque sequências que tem o mesmo tamanho podem comigrar como uma única banda no gel, ou seja, há um baixo poder de resolução em termos de diferentes composições de bases, em moléculas de DNA com o mesmo tamanho. Dessa forma, optou-se por sequenciar de 10 a 12 colônias por TDF, a fim de realizar a anotação do TDF com base na sequência mais frequente.

Cada reação de sequenciamento foi realizada com 2 µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix*, 1 µL de *BigDye® Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer*, 1 µL de iniciador M13F ou M13R (5 µM), de 100-300 ng de plasmídeo contendo o inserto, completando com água ultrapura até um volume final de 10 µL, quando necessário. As condições da reação de sequenciamento foram: 96ºC por 1 minuto, 25 ciclos (96ºC por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos, 60ºC por 4 minutos), sendo que dos 96ºC para os 50ºC, a rampa utilizada foi de 1ºC por segundo.

A purificação pós-reação foi realizada com Etanol/EDTA e o sequenciamento foi conduzido no sequenciador *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

Para a análise da qualidade das sequências foram utilizadas as ferramentas da base de dados do *Ribosomal Database Project* (RDP), a qual realizou a trimagem das sequências, removendo as regiões da sequência correspondentes ao vetor, e, aceitando somente as bases com qualidade *Phred* maior que 20. As sequências com boa qualidade foram anotadas utilizando o genoma do feijoeiro comum, disponível na base de dados *Phytozome* (http://www.phytozome.net).

3.2.5 Validação da técnica de cDNA-AFLP através de RT-qPCR

Dentre os TDFs anotados, foram selecionados nove para realizar a validação por *RT-qPCR*. Essa seleção foi baseada na sua alta expressão (alta intensidade das bandas no gel de poliacrilamida) e em seu potencial de contribuir para a tolerância à seca nas plantas, com base na anotação realizada.

Para o desenho dos iniciadores, foi utilizado o programa Primer3, considerando como parâmetros: (i) temperatura de *melting* - Tm: mínima = 58ºC, ótima = 60°C e máxima = 62°C; (ii) tamanho do fragmento: entre 100 e 200 pb; (iii) tamanho do iniciador: mínimo = 18, ótimo = 20 e máximo = 22; (iv) conteúdo de GC: entre 50 e 60% (Tabela 3).

A escolha dos genes de referência para esse estudo foi baseada no estudo de Borges, Tsai e Caldas (2012), no qual foram comparados vários genes de referência com relação à sua estabilidade, em diferentes órgãos de feijoeiro comum sob estresse abiótico, indicando os genes Actina11 e β-Tubulina8 como os mais estáveis (Tabela 4).

A síntese de cDNA, para as reações de *RT-qPCR*, foi realizada usando o kit *Maxima®* *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*, de acordo com as instruções do fabricante. As reações de *RT-qPCR* foram realizadas no equipamento *StepOne Plus™ Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

Os dados brutos liberados pelo *software* do equipamento foram processados no programa *LinReg PCR (11.0)*. Após o processamento inicial dos dados, foi usado o programa *REST 2009* (*QIAGEN*) para estimar a regulação da expressão gênica (positiva – indução ou negativa – repressão) para cada transcrito estudado, e também para determinar a significância estatística de cada valor de expressão relativa obtido.

Tabela 3 - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os genes-alvo através de *RT-qPCR*

TDF	Anotação funcional	Sequência 5' – 3' (*Forward/Reverse*)	*Amplicon* (pb)
B7R	*Ribosomal protein S7e*	CCCGAAGGAGAGAAACAACA GCCTCTGCGACAGGATACTC	105
C2R	"novo"	GTACCAAGCCCCGATGAGTA ACATGGAACCTTTCCCCTCT	151
R1	*S-adenosylmethionine synthetase*	GGCTCGTCTCACTGAGGTTC TGGCACCCTTGTCATTGTAA	101
R15	*Serine protease family S1C HtrA-related*	GTTCCTATTCCTGGGGATGC AATCATGCCAATGCAACAGA	150
B3C	*Glycosyl hydrolase family 14*	TGGGAATTTCCTGGTATTGG GCCTGCGTCATCTGGTAGTT	117
B6C	*Serine-threonine protein kinase*	TGGAACGAGTGTGGTGAGTG TCTCCTCAACGTGGCTTTG	114
C1C	*S-adenosylmethionine synthetase*	GGCTCGTCTCACTGAGGTTC TGGCACCCTTGTCATTGTAA	101
C5C	"novo"	GTACCAAGCCCCGATGAGTA ACATGGAACCTTTCCCCTCT	151
C6C	*Legume lectin domain*	AAGAACGCTCTTCAGGTCCA AACGCCGAGGTTCATATCAC	120

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os genes de referência

GI (NCBI)	Abreviação	Anotação funcional	Sequência 5' – 3' (*Forward/Reverse*)	*Amplicon* (pb)
62703083	Act11	Actin-11	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	190
171656465	β-Tub8	Tubulin beta-8	AATGTGAAGTCCAGCGTGTG CTTCCCCAGTGTACCAATGC	163

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Experimento em casa-de-vegetação

O genótipo tolerante à seca (BAT 477) apresentou um desenvolvimento do sistema radicular bastante superior quando comparado ao genótipo suscetível (IAC-Carioca 80SH), ambos sob seca (Figura 3).

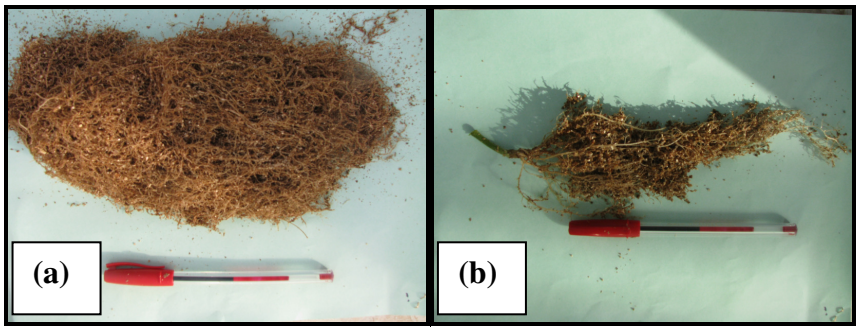

Figura 3 - Raízes dos dois genótipos, sob 72 horas de déficit hídrico. (a) BAT 477; (b) IAC-Carioca 80SH

Plantas tolerantes à seca desenvolveram ao longo do tempo a habilidade de manter a integridade dos tecidos vasculares sob estresse, pois um floema funcional atua na transmissão de sinais a longa distância, o que é de extrema importância para a adaptação sistêmica ao estresse (MONTERO-TAVERA; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE-CÁZARES, 2008). Então, espera-se que plantas que apresentam uma maior tolerância a estresses abióticos, tais como a seca, sejam capazes de proteger melhor os seus tecidos condutores e suas raízes.

3.3.2 Extração de RNA total

Foram realizadas a quantificação do RNA extraído e a eletroforese em gel de agarose 1,5% para a verificação da sua qualidade e integridade, evitando o uso de RNA de baixa qualidade ou degradado nas próximas etapas. Os RNAs extraídos apresentaram boa qualidade e ausência de degradação (Figura 4).

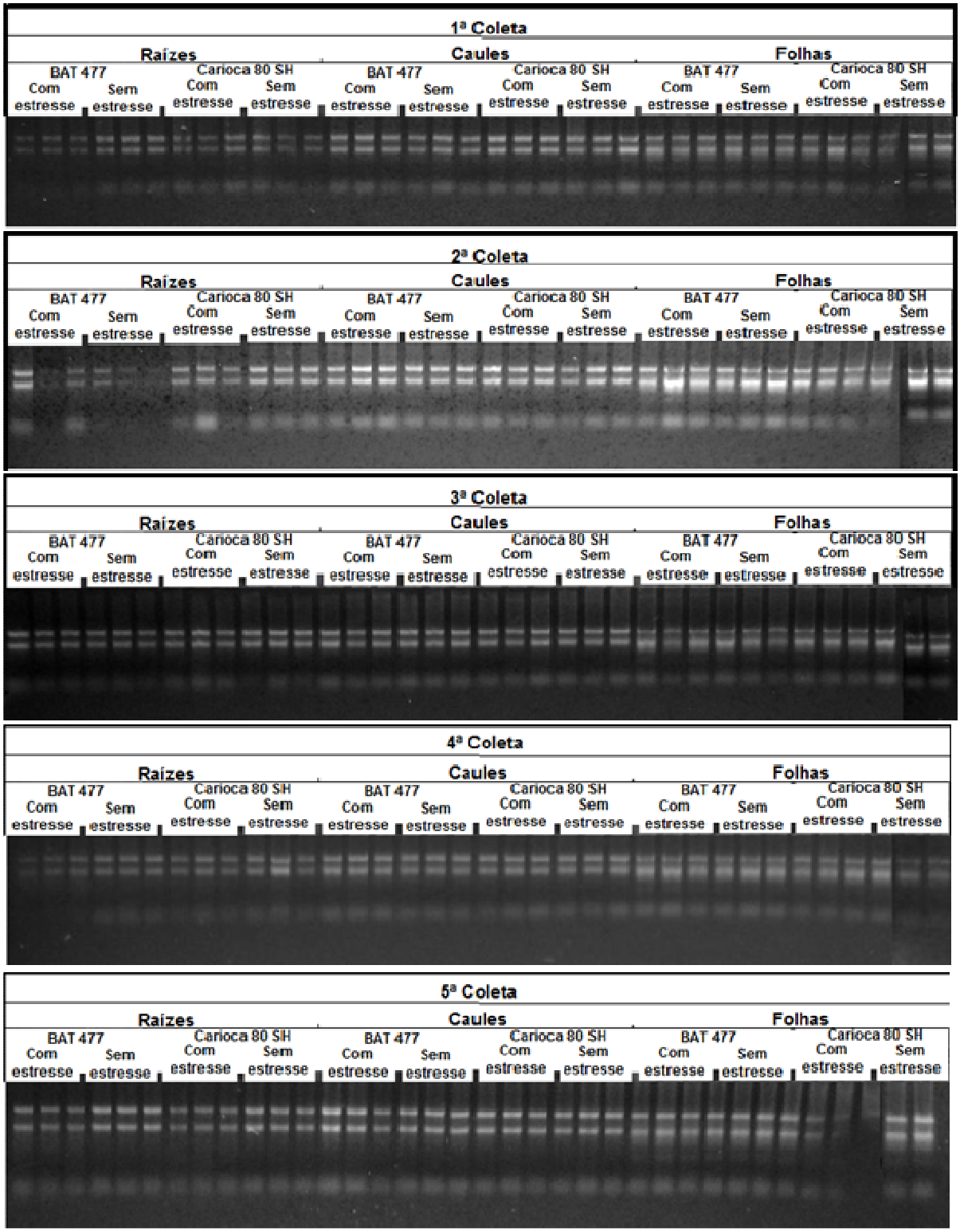

Figura 4 - Géis de agarose 1,5%, corados com *GelRed,* com 1 µg de RNA total por amostra

3.3.3 Atividade da enzima catalase

A enzima catalase é sintetizada pelos polirribossomos livres no citossol de todas as células eucarióticas e importada pelos peroxissomos, onde é estocada. Essa enzima atua diretamente na degradação de H_2O_2 em $H_2O + O_2$ (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004) e a sua ação é extremamente rápida, pois uma molécula de catalase é capaz de degradar até 40 milhões de moléculas de H_2O_2 por segundo (NELSON; COX, 2005). É importante notar que a atividade da catalase aumenta consideravelmente quando a planta está passando por estresse oxidativo (ZLATEV et al., 2006), o que é bastante comum quando as plantas estão sob déficit hídrico. Por esse motivo, decidiu-se medir a atividade dessa enzima nos dois genótipos (tolerante e suscetível), tanto sob 24 h de déficit hídrico, quanto na condição controle, a fim de confirmar, fisiologicamente, que as plantas submetidas à condição de seca encontravam-se realmente sob estresse no momento da primeira coleta.

De posse dos valores de atividade da catalase, foi realizada a análise de variância, comprovando a ocorrência de diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância para experimento em blocos casualizados

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	1816,280	908,140	2,98 ns
Tratamentos	3	41242,172	13747,391	45,14 **
Resíduo	6	1827,163	304,527	
Total	11	44885,615		

ns: não significativo ($p >= 0,05$)

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

A atividade da enzima catalase apresentou um aumento substancial com a imposição de déficit hídrico (Figura 5). Pode-se observar que ambos os genótipos tiveram um aumento na atividade da catalase quando o estresse foi induzido, contudo, o genótipo tolerante, além de já ter um nível basal mais elevado do que o apresentado pelo suscetível, sofreu um considerável aumento quando o estresse foi induzido. O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou um aumento na atividade da catalase, contudo, apenas conseguiu atingir um nível similar ao do genótipo tolerante na condição controle.

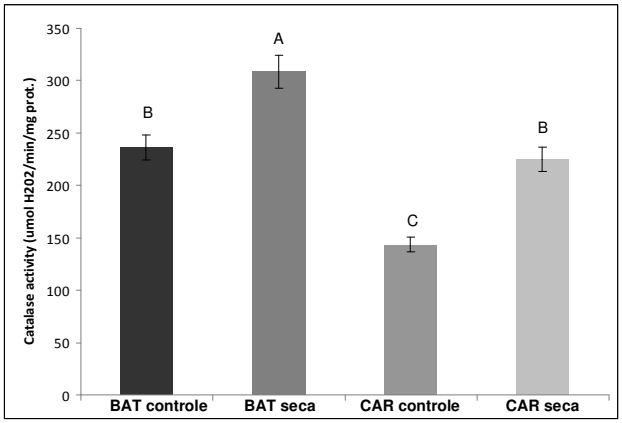

Figura 5 - Atividade da enzima catalase nos genótipos tolerante (BAT 477) e suscetível (IAC-Carioca 80SH), tanto na condição controle, quanto com 24 h de déficit hídrico. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes entre si ($p < 0,01$) pelo Teste de Tukey

3.3.4 Técnica de *cDNA-AFLP*

A técnica *cDNA-AFLP* é uma variação do *Amplified Fragment Length Polymorphism* (*AFLP*). Enquanto o *AFLP* usa DNA para detectar polimorfismos em diferentes regiões genômicas simultaneamente, o *cDNA-AFLP* usa cDNA para quantificar diferenças nos níveis de expressão gênica. É importante lembrar que essa técnica está entre as poucas opções disponíveis que possibilitam identificar o nível transcricional de genes previamente desconhecidos, mas que apresentam padrões de expressão de interesse (BREYNE; ZABEAU, 2001). Outra vantagem dessa técnica é a sua elevada sensibilidade, isto é, a habilidade de detectar transcritos de baixa abundância (FUKUMURA et al., 2003), os quais são difíceis de serem obtidos usando a técnica de microarranjos (EVANS et al., 2002). Diferenças de intensidade das bandas no gel refletem diferenças nos níveis de expressão dos genes (SHI et al., 2011). Além disso, as bandas de interesse podem ser sequenciadas e, então, novos genes relevantes para o processo biológico em estudo podem ser encontrados.

Assim, através da técnica de *cDNA-AFLP*, foram obtidos os perfis transcricionais dos genótipos tolerante (BAT 477) e suscetível (IAC-Carioca 80SH), ambos sob déficit hídrico, possibilitando a seleção de TDFs diferencialmente expressos em ambos os genótipos, para cada órgão vegetal (Figuras 6 a 11). E, dentre os TDFs isolados, 45 foram sequenciados e anotados (Tabelas 6 e 7). Além disso, foram obtidos os perfis transcricionais do genótipo tolerante, para cada órgão vegetal, sob as condições de déficit hídrico e controle (Figuras 13 a 15).

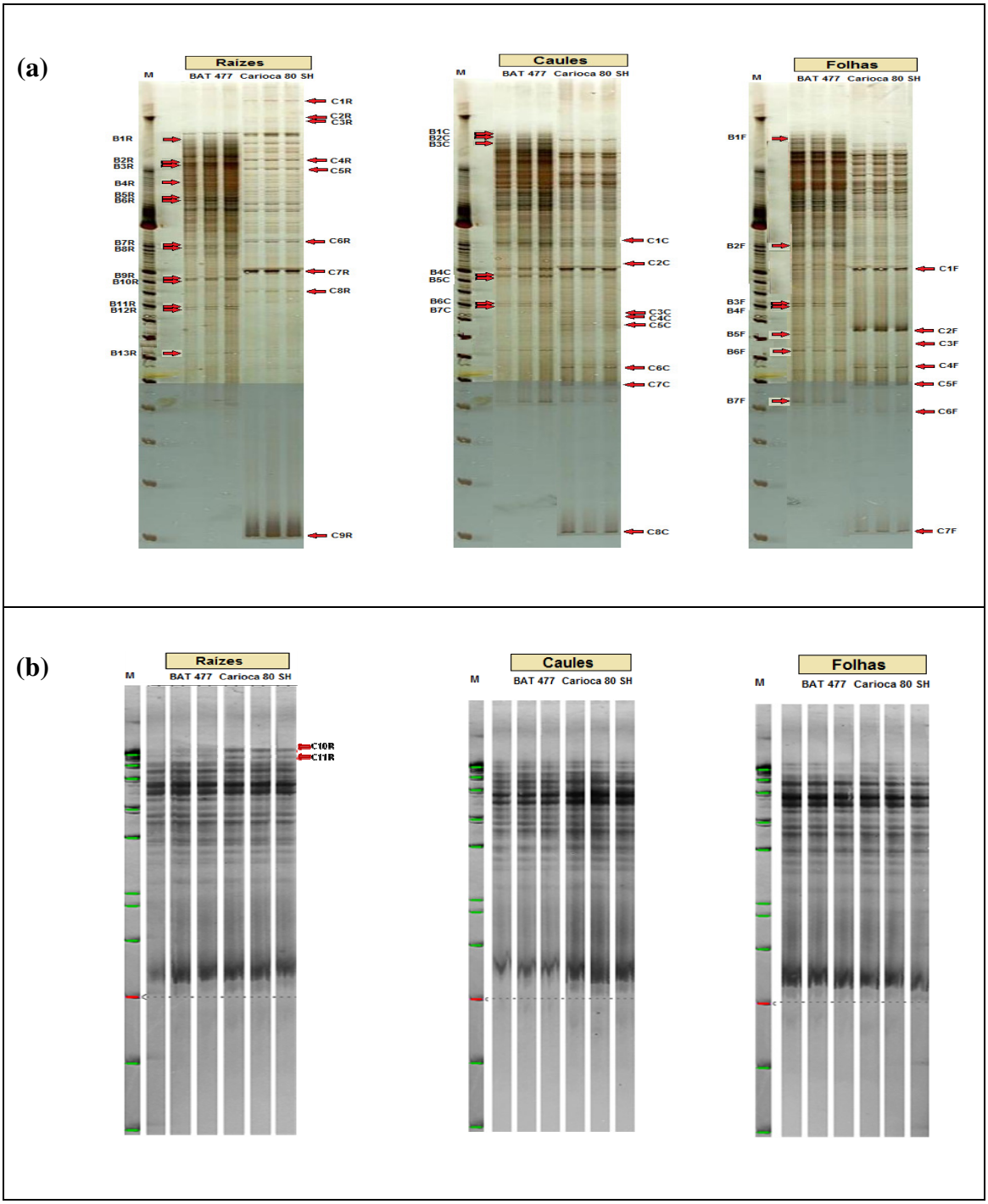

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a 72 horas de déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0, M: marcador molecular de 100 pb; (b) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A, M: marcador molecular de 1 kb

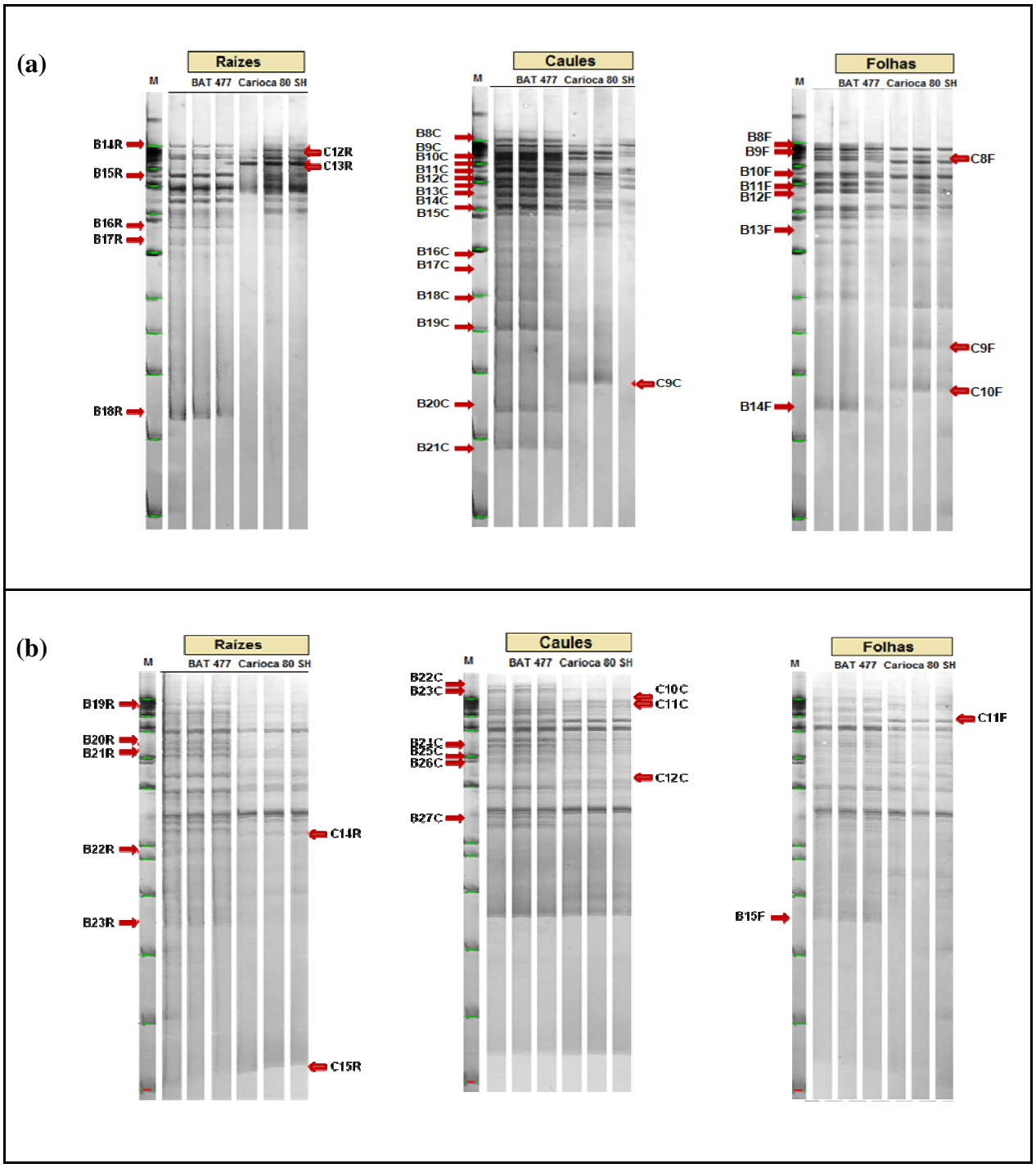

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a 72 horas de déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-0. M: marcador molecular de 1 kb

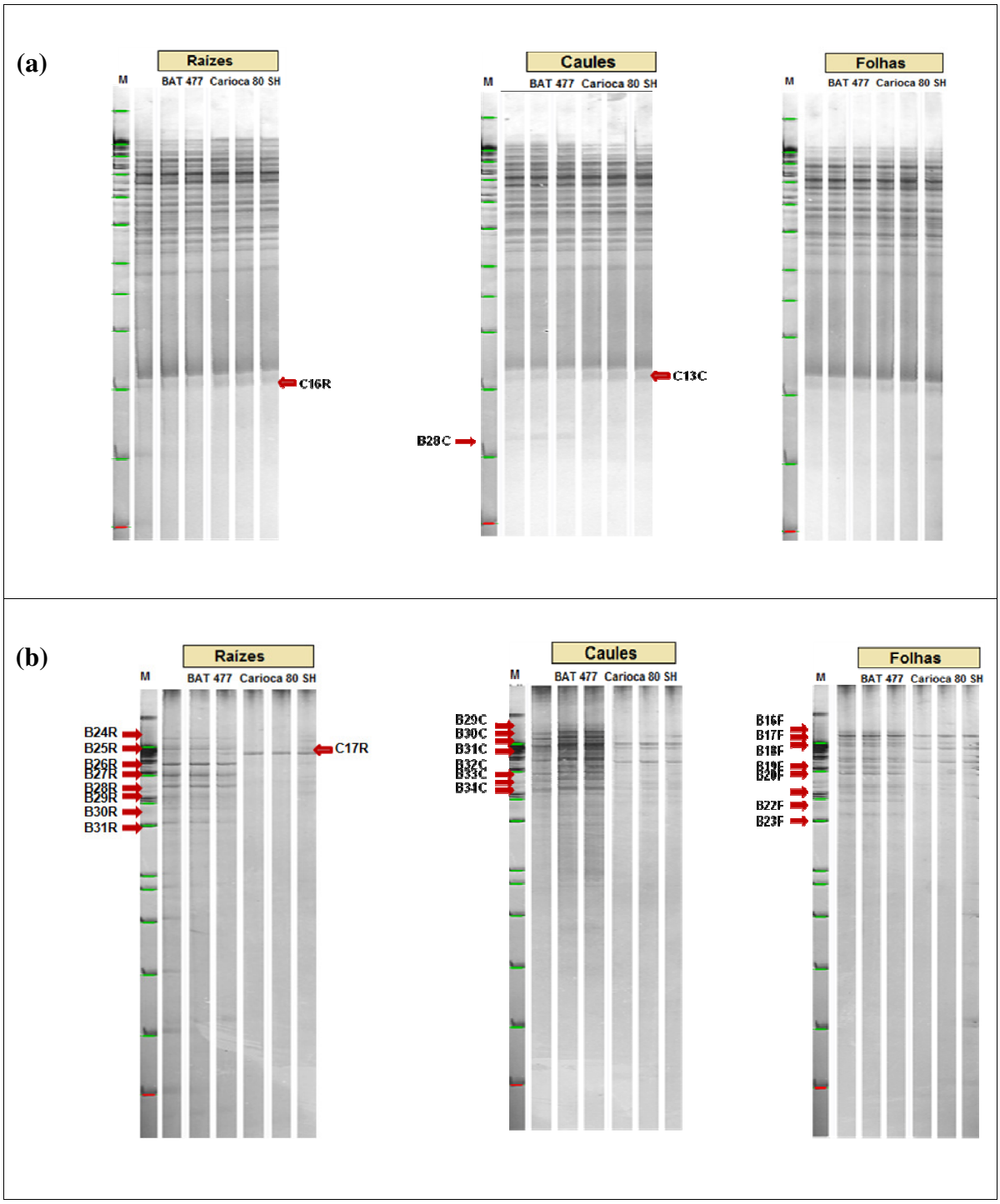

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a 72 horas de déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-A; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-T. M: marcador molecular de 1 kb

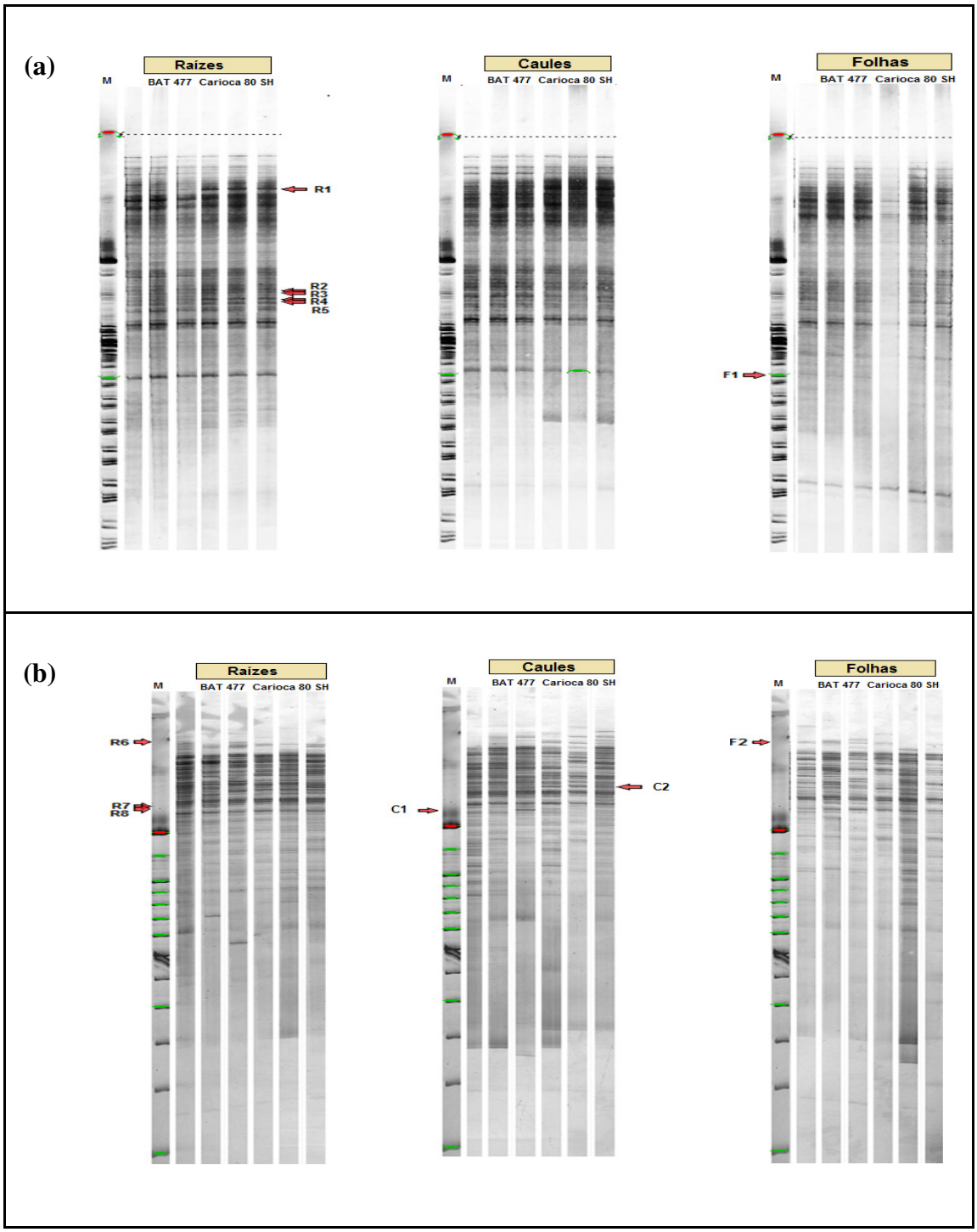

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a cinco coletas temporais, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0; (b) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A. M: marcador molecular de 100 pb

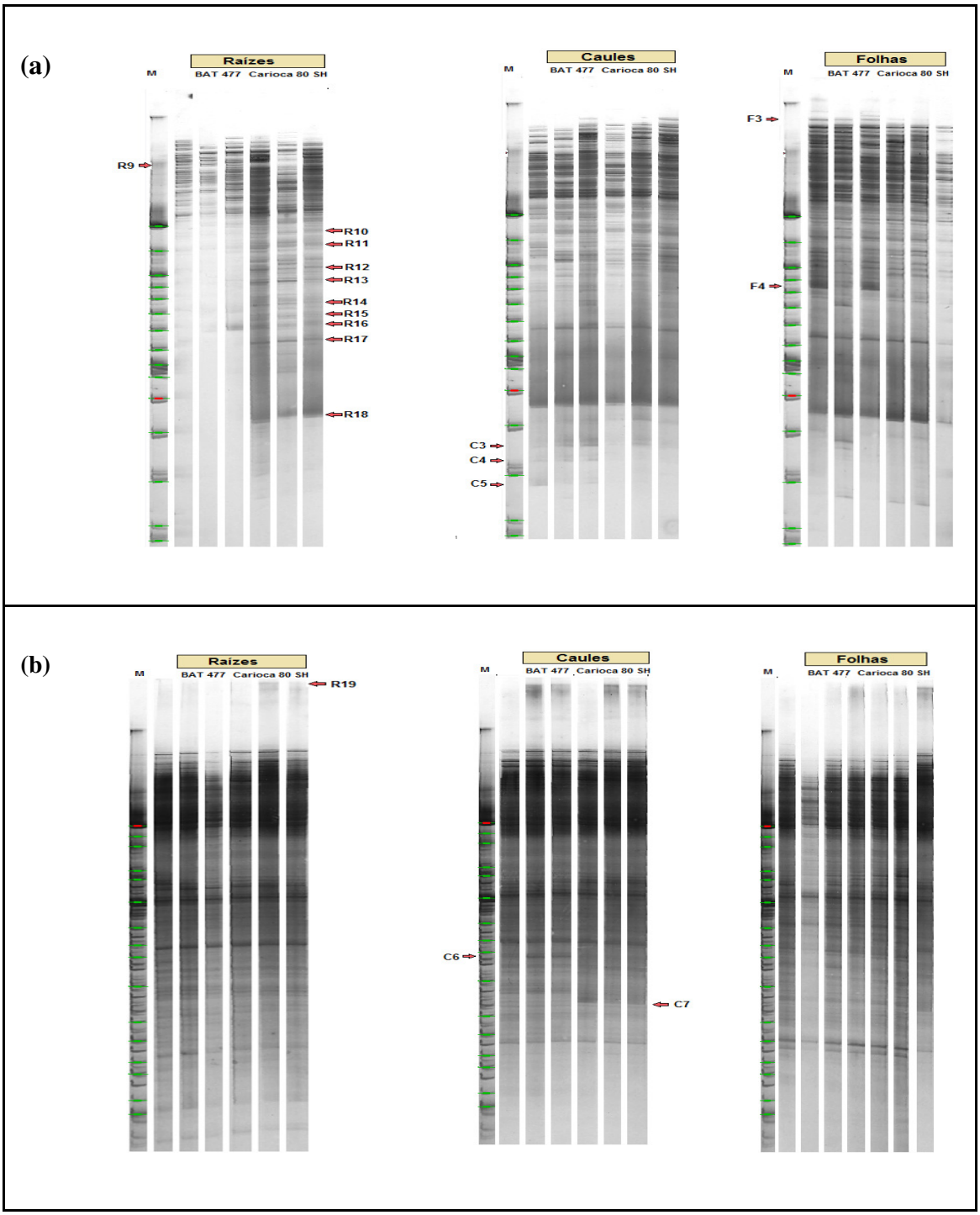

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a cinco coletas temporais, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-0. M: marcador molecular de 100 pb

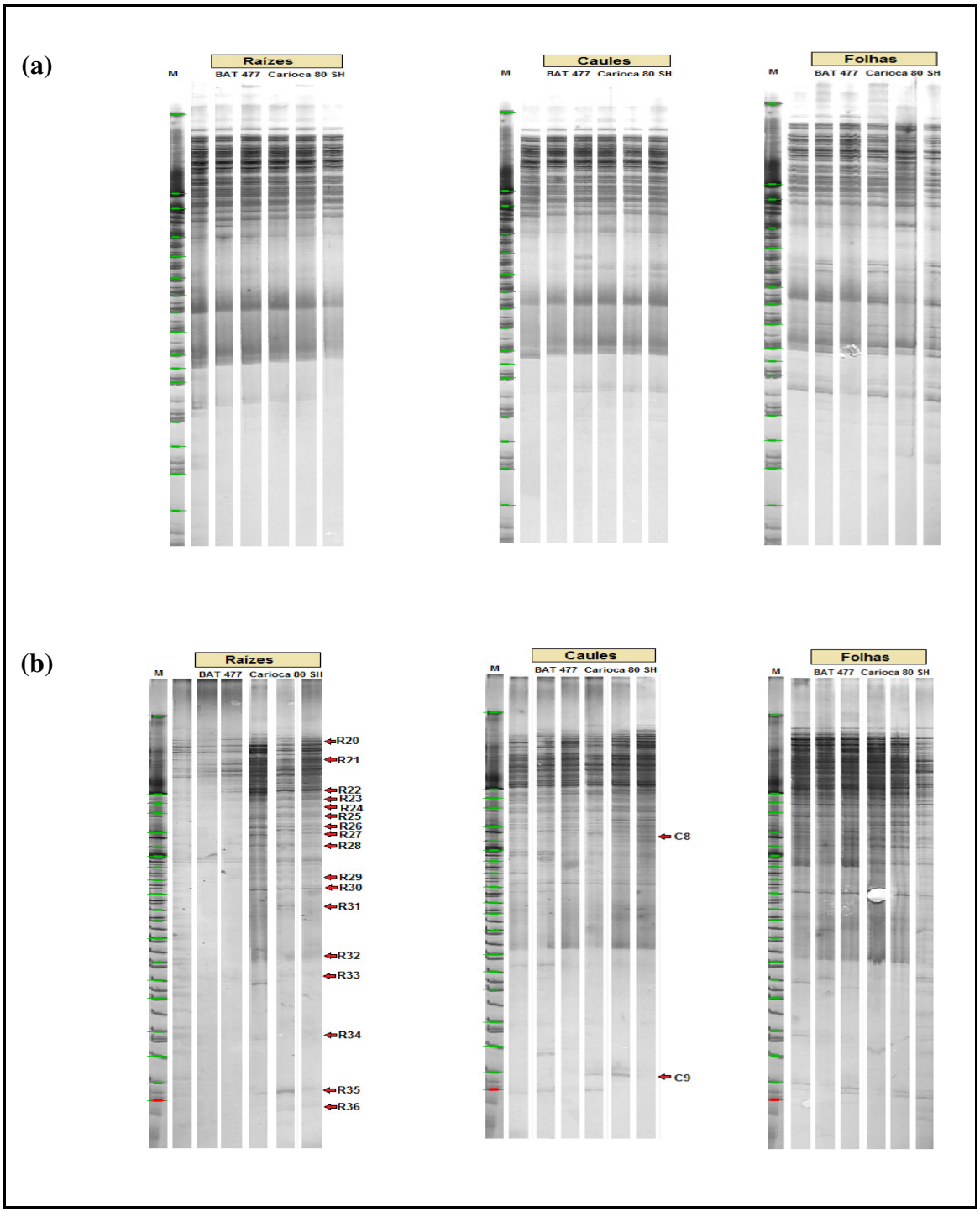

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477 e IAC-Carioca 80SH sujeitos a cinco coletas temporais, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-A; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-T. M: marcador molecular de 100 pb

Observando os géis de poliacrilamida, pode-se afirmar que as seis combinações de iniciadores utilizados para realizar as amplificações seletivas foram suficientes para detectar um bom número de TDFs diferencialmente expressos nos dois genótipos, nos três órgãos vegetais estudados, sendo que houve um maior número de TDFs diferencialmente expressos nas raízes, seguida por caules e um menor número nas folhas (Figura 12).

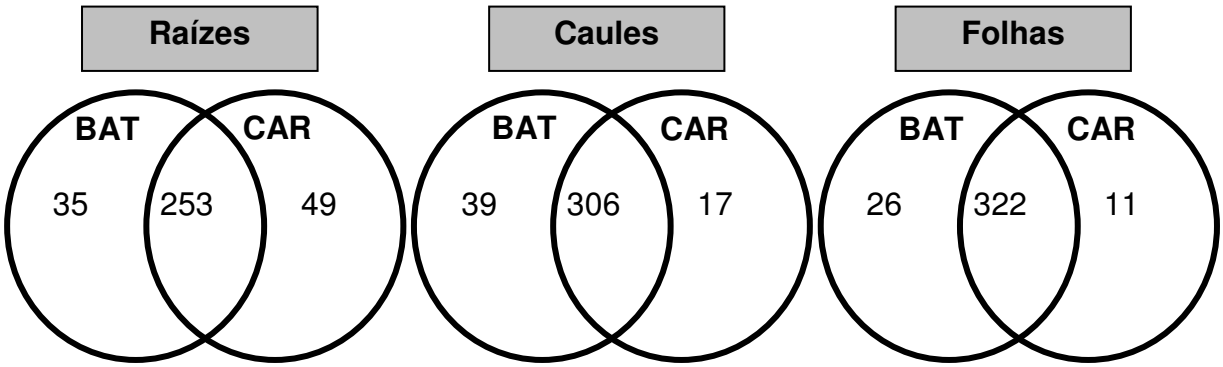

Figura 12 - Diagramas de Venn, com o número de TDFs visualizados nos géis de poliacrilamida, contrastando os dois genótipos, a partir das seis combinações de iniciadores utilizados na amplificação seletiva

Tabela 6 - Transcritos preferencialmente expressos no genótipo tolerante

Transcrito	Tecido	Anotação		
		E-value	*Pfam*	*KEGGORTH/Panther/KOG*
B1R	Raízes	1,0 e^{-50}	*Chlorophyll A-B binding protein*	*Photosystem II 22 kDa protein*
B4R	Raízes	9,5 e^{-41}	*Ribulose biphosphate carboxylase large chain, catalytic domain*	-
B6R	Raízes	1,2 e^{-61}	*Peroxidase*	*L-ascorbate peroxidase*
B7R	Raízes	5,5 e^{-64}	*Ribosomal protein S7e*	*Small subunit ribosomal protein S7e*
B8R	Raízes	5,5 e^{-75}	*Mitochondrial carrier protein*	*Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator)*
B11R	Raízes	3,1 e^{-10}	*DNAJ domain*	*DNAJ / HSP40*
R8	Raízes	3,5 e^{-123}	*Aconitase family (aconitate hydratase)*	*Aconitase*
B1C	Caules	1,8 e^{-152}	*HSP70 protein*	*Heat shock protein 70 kDa*
B3C	Caules	5,9 e^{-129}	*Glycosyl hydrolase family 14*	-
B5C	Caules	3,5 e^{-58}	*AMP-binding enzyme*	*4-coumarate-CoA ligase*
B6C	Caules	2,4 e^{-7}	*Protein kinase domain*	*Serine-threonine protein kinase, plant type*
B7C	Caules	6,9 e^{-93}	*IMP dehydrogenase/GMP reductase domain*	*IMP dehydrogenase*
C1	Caules	4,0 e^{-54}	*Trehalose-phosphatase*	*Trehalose-6-phosphate synthase*
C5	Caules	5,5 e^{-90}	*Zinc-finger, C_3HC_4 type (Ring finger)*	*E3 ubiquitin ligase*
C6	Caules	9,5 e^{-25}	*Fructose biphosphate aldolase class-I*	*Fructose biphosphate aldolase class-I*

continua

conclusão

Transcrito	Tecido	Anotação		
		E-value	*Pfam*	*KEGGORTH/Panther/KOG*
B3F	Folhas	4,4 e^{-83}	*Mediator complex subunit 13 C-terminal*	-
B4F	Folhas	2,4 e^{-30}	*Mov34 / MPN / PAD-1 family*	*Translation initiation factor eIF-3 subunit 5*
B5F	Folhas	5,0 e^{-37}	*MtN3*	*Stromal cell protein / aquaporin nodulin MTN-3-related*
B6F	Folhas	8,7 e^{-34}	*Ribosomal protein L1p / L10e family*	*60S Ribosomal protein L10A-related*
B7F	Folhas	1,1 e^{-51}	*TCP family transcription factor*	-
F2	Folhas	2,7 e^{-35}	*Ribosomal protein L11*	*Large subunit ribosomal protein L11*

Tabela 7 - Transcritos preferencialmente expressos no genótipo suscetível

Transcrito	Tecido	Anotação		
		E-value	*Pfam*	*KEGGORTH/Panther/KOG*
C1R	Raízes	8,0 e^{-107}	*Carbonic anhydrase*	*Carbonic anhydrase*
C2R	Raízes	-	"novo"	"novo"
C4R	Raízes	-	"novo"	"novo"
C5R	Raízes	4,7 e^{-108}	*Dihydrodipicolinate reductase*	*Dihydrodipicolinate reductase*
C6R	Raízes	2,6 e^{-79}	*Ribulose-biphosphate carboxylase large chain, catalytic domain*	-
R1	Raízes	4,2 e^{-172}	*S-adenosylmethionine synthetase*	*S-adenosylmethionine synthetase*
R2	Raízes	1,1 e^{-82}	*Coatomer WD associated region*	*Coatomer protein complex, subunit alpha (xenin)*
R3	Raízes	6,0 e^{-97}	*Zinc-finger domain of monoamine-oxidase A repressor R1*	-
R4	Raízes	6,9 e^{-75}	*Cobalamin-independent methionine synthase*	*5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine*
R5	Raízes	4,3 e^{-99}	*Mitochondrial carrier protein*	*Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator)*
R10	Raízes	5,2 e^{-9}	*Synaptobrevin*	*Synaptobrevin homolog YKT6*
R11	Raízes	8,2 e^{-85}	*Haloacid dehalogenase-like hydrolase*	*2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase 2*
R12	Raízes	5,3 e^{-69}	*ADP-ribosylation factor family*	*ARF/ SAR family*
R14	Raízes	2,6 e^{-48}	*mTERF*	*Mitochondrial transcription termination factor, mTERF*

continua

conclusão

Transcrito	Tecido	Anotação		
		E-value	*Pfam*	*KEGGORTH/Panther/KOG*
R15	Raízes	9,0 e^{-41}	*PDZ domain (also known as DHR or GLGF)*	*Serine protease family S1C HtrA-related*
R18	Raízes	5,8 e^{-93}	*Haloacid dehalogenase-like hydrolase*	*Arsenite-transporting ATPase*
C1C	Caules	2,6 e^{-160}	*S-adenosylmethionine synthetase*	*S-adenosylmethionine synthetase*
C5C	Caules	-	"novo"	"novo"
C6C	Caules	1,9 e^{-121}	*Legume lectin domain*	-
C7C	Caules	-	"novo"	"novo"
C8C	Caules	2,5 e^{-16}	"novo"	"novo"
C2	Caules	2,9 e^{-85}	*Plant organelle RNA recognition domain*	-
C7	Caules	5,3 e^{-18}	*Ribosomal protein L34e*	*60S Ribosomal protein L34*
C4F	Folhas	4,1 e^{-78}	*ARID/BRIGHT DNA binding domain*	*SWI/SNF – related chromatin binding protein*

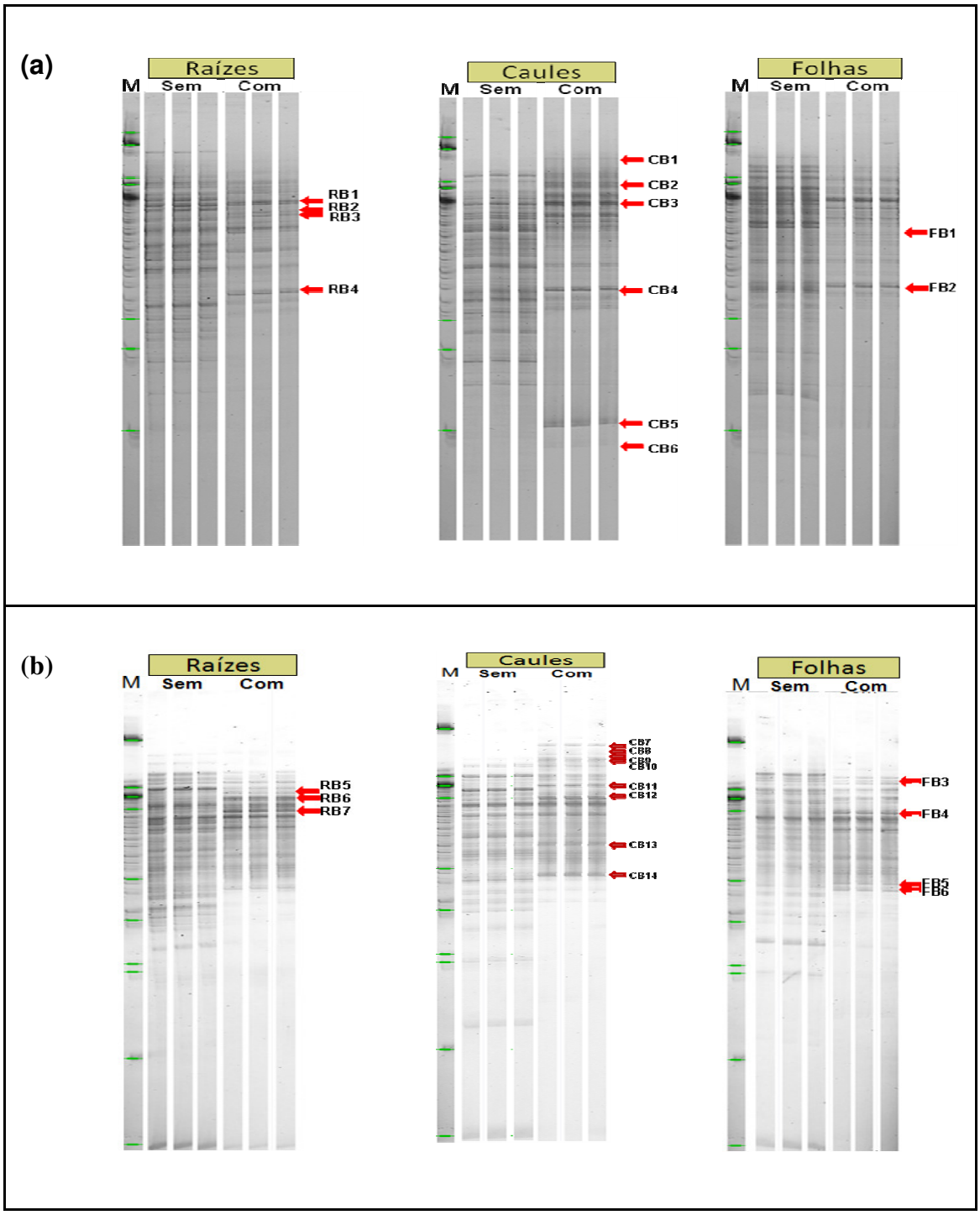

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477. Perfil transcricional do genótipo tolerante na condição controle e sob déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0; (b) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A. M: marcador molecular de 100 pb

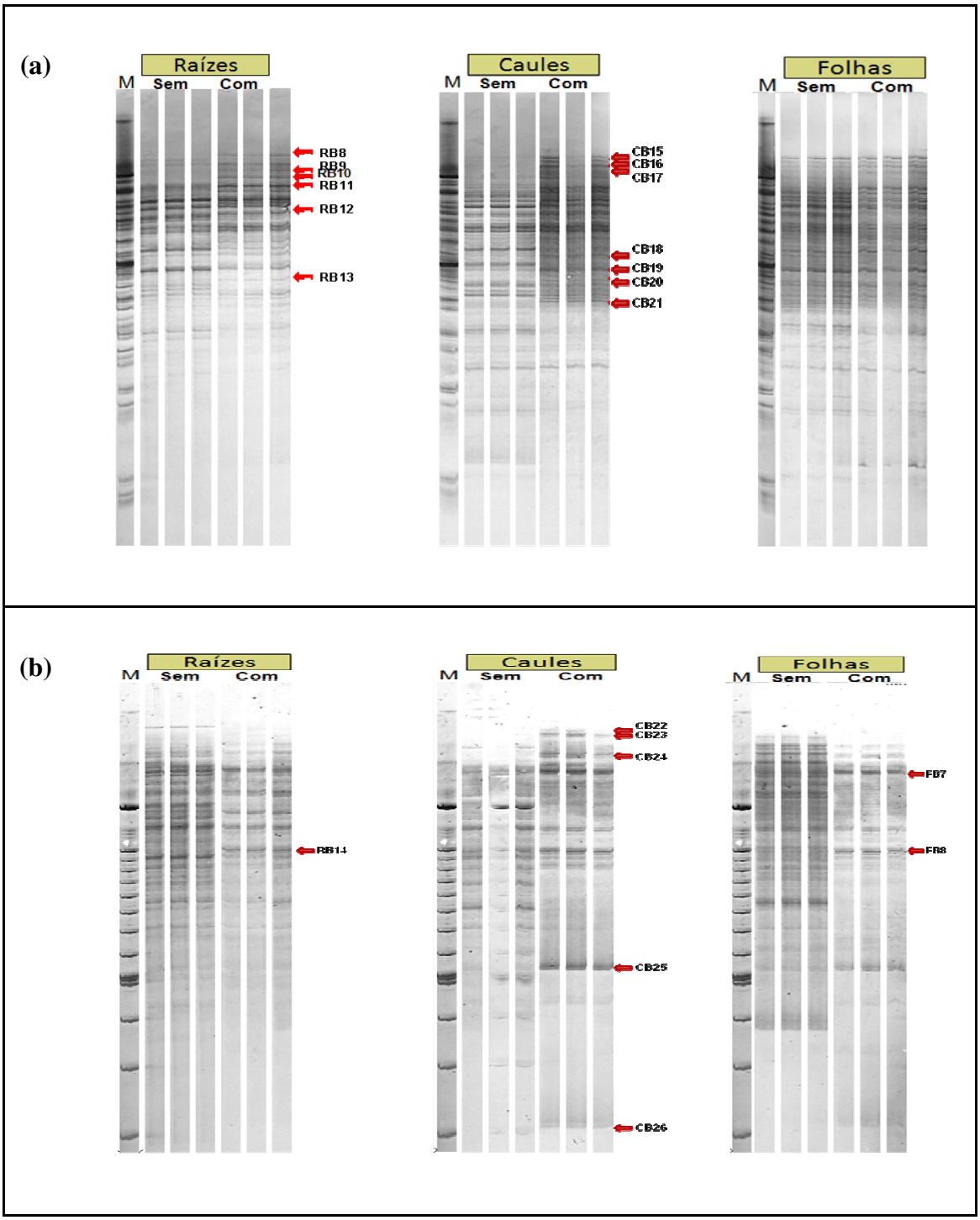

Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477. Perfil transcricional do genótipo tolerante na condição controle e sob déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-0. M: marcador molecular de 100 pb

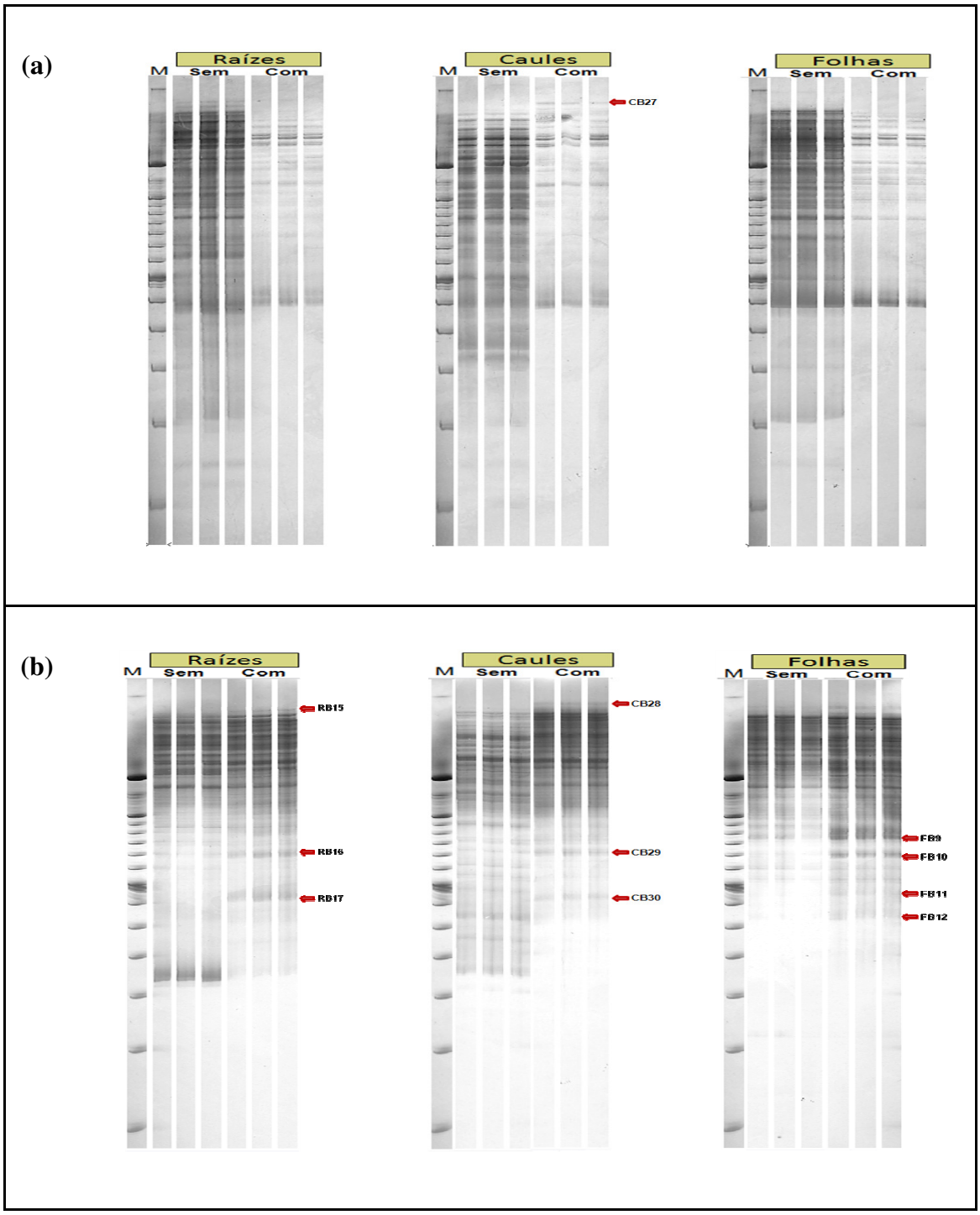

Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Amostras de cDNA provenientes de raízes, caules e folhas de BAT 477. Perfil transcricional do genótipo tolerante na condição controle e sob déficit hídrico. Amplificação seletiva com os iniciadores: (a) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-A; (b) *Eco*RI-AGC e *Mse*I-T. M: marcador molecular de 100 pb

3.3.4.1 Transcritos detectados preferencialmente no genótipo tolerante

Os TDFs que apresentaram as bandas com maior intensidade no genótipo tolerante provavelmente estão relacionados com a resposta diferencial desse genótipo, que contribui para que ele apresente mais tolerância à seca do que o genótipo suscetível.

Nas raízes do genótipo tolerante, tiveram uma expressão mais pronunciada os transcritos: *chlorophyll A-B binding protein* (B1R), *peroxidase* (B6R), *ribosomal protein S7e* (B7R), *HSP40* (B11R) e *aconitate hydratase* (R8).

As proteínas *chlorophyll A-B binding* são solúveis em água e induzidas por seca e calor, o que sugere sua função protetora durante essas condições de estresses abióticos (SATOH et al., 2001).

Há muitas isoformas de peroxidases que estão envolvidas no último passo da lignificação da parede celular e são diferencialmente expressas durante o déficit hídrico (SATO et al., 1995). Sendo assim, as peroxidases estão envolvidas em processos relacionados ao metabolismo da parede celular, incluindo a ligação cruzada de monolignóis (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004), e, além disso, também podem agir na suberização, ligação cruzada de proteínas estruturais da parede celular, defesa contra o ataque de patógenos, proteção contra o estresse oxidativo, elongação celular e produção de espécies reativas de oxigênio (HIRAGA et al., 2001).

As proteínas ribossomais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento apropriado de qualquer organismo. Contudo, ainda não se conhece muito a respeito da regulação da expressão de genes que codificam para proteínas ribossomais em plantas, mas, muitas proteínas ribossomais têm sido relatadas como induzidas ou reprimidas sob várias condições estressantes (GAO et al., 1994; SAEZ-VASQUEZ; GALLOIS; DELSENY, 2000; KIM et al., 2004; BROSCHÉ; STRID, 1999; LUDWIG; TENHAKEN, 2001).

Há relatos de que a repressão dos transcritos da enzima a*conitate hydratase* em folhas de tomate selvagem leva ao aumento da taxa de assimilação de CO_2 e da síntese fotossintética de sacarose (LEMBKE et al., 2012). Então, o aumento da expressão desse transcrito em resposta à seca, observado no presente trabalho, pode contribuir para a redução da fotossíntese, devendo-se ter cautela no uso desse transcrito, pois a sua superexpressão pode resultar em perda de produtividade. Contudo, como o aumento da expressão desse transcrito ocorreu na raíz, que é um órgão vegetal que não realiza fotossíntese, essa indução pode ter ocorrido simplesmente pelo fato de que a fotossíntese é dispensável nesse órgão vegetal.

Nos caules do genótipo tolerante, tiveram uma expressão mais pronunciada os transcritos: *HSP70* (B1C), *glycosyl hydrolase* (B3C), *4-coumarate-CoA ligase* (B5C), s*erine-threonine protein kinase* (B6C), *IMP dehydrogenase/GMP reductase* (B7C), *trehalose-6-phosphate synthase* (C1), *E3 ubiquitin ligase* (C5), *fructose biphosphate aldolase* (C6).

As chaperonas *HSP70*, juntamente com as suas co-chaperonas (*DNAJ/HSP40* e *GrpE*) atuam em uma série de maquinarias celulares, que auxiliam no processo de dobramento de uma ampla gama de proteínas, na maior parte dos compartimentos celulares (WANG et al., 2004). Essas proteínas são de extrema importância na manutenção do funcionamento celular adequado, sob condições de estresses abióticos, desempenhando funções essenciais na prevenção da agregação e auxiliando no dobramento de proteínas, tanto sob condições normais, quanto sob condições estressantes (HARTL, 1996; FRYDMAN, 2001). Elas também estão envolvidas nos processos de importação e translocação de proteínas, além de facilitarem a degradação proteolítica de proteínas instáveis, marcando essas proteínas para que sejam direcionadas aos lisossomos e proteossomos (HARTL, 1996).

A família de proteínas *glycosyl hydrolase* compreende as enzimas com atividade β-amilase, as quais hidrolisam as ligações 1,4-α-glicosídicas em substratos como os polissacarídeos do tipo amido, por meio da remoção sucessiva de unidades maltose das extremidades de cadeias não-reduzidas (BRAY, 2004). Cabe lembrar que um aumento do fornecimento de açúcares é requerido para que as células com déficit hídrico sobrevivam. Stewart (1971) verificou que a condição de seca causa uma conversão ativa de amido em sacarose nas folhas do feijoeiro, comprovando a importância dessa família de proteínas, na manutenção do equilíbrio osmótico das células sob estresse.

A enzima *4-coumarate-CoA ligase* participa da biossíntese de fenilpropanóides, sendo responsável pela transformação de *4-coumarate* em *4-coumaroyl-CoA* (VERVERIDIS et al., 2007). Várias enzimas tais como *4-coumarate-CoA ligase* (HU et al., 1999) *caffeate O-metyltransferase* (VINCENT et al., 2005) e *coniferyl aldehyde 5-hidroxylase* (LI et al., 2003) estão envolvidas na regulação da abundância relativa de monolignóis, tais como, *coumaroyl*, *coniferyl* e *sinapoyl*, os quais podem ser polimerizados em lignina. Em um estudo recente, Alvarez et al. (2008) encontraram que substratos da enzima *4-coumarate-CoA ligase*, *caffeic acid* e *p-coumaroyl*, acumulam-se no xilema de plantas sob déficit hídrico e a acumulação desses monolignóis no xilema sugere que a seca reduz a biossíntese de lignina (VINCENT et al., 2005), o que pode ocasionar a perda de sustentação da planta sob estresse, não sendo portanto um transcrito de interesse para incrementar a tolerância à seca.

Em um estudo recente, Mao et al. (2010) produziram uma *Arabidopsis* transgênica, superexpressando a proteína *TaSnRK2.4* (uma *serine/threonine protein kinase*), o que resultou em um aumento da tolerância aos estresses hídrico, salino e por frio, sendo comprovado por resultados fisiológicos, incluindo: redução da taxa de perda de água e aumento do conteúdo relativo de água, da estabilidade da membrana celular, do potencial de fotossíntese e do potencial osmótico. Assim, a superexpressão da proteína *TaSnRK2.4* apresenta potencial para uso na transgenia, a fim de melhorar a tolerância a estresses abióticos também em outras culturas agrícolas.

A enzima *IMP dehydrogenase* (inosina-5'-monofosfato desidrogenase) converte a inosina monofosfato em xantosina monofosfato (MAGASANIK; MOYED; GEHRING, 1957; TURNER; KING, 1961; HEDSTROM, 2009; PIMKIN; MARKHAM, 2009). Por sua vez, a enzima *GMP reductase* (guanosina 5'-monofosfato oxidorredutase) catalisa a desaminação redutora irreversível e NADPH-dependente de GMP a IMP (ANDREWS; GUEST, 1988). Até o momento não foi reportada nenhuma relação entre essas enzimas e um aumento da tolerância a estresses abióticos.

A *trehalose* é um dissacarídeo não-redutor e desempenha uma importante função na regulação metabólica da tolerância a estresses abióticos, em uma ampla variedade de organismos, atuando principalmente na osmorregulação (LI et al., 2011). A introdução por transgenia de uma *trehalose* de leveduras (*TPS1*) em tomate resultou no aumento da quantidade de clorofila e amido, além de aumentar a tolerância contra seca, sal e estresse oxidativo (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2005). Plantas de arroz superexpressando genes biossintéticos de *trehalose* (*otsA* and *otsB*) de *E. coli* exibiram menores danos foto-oxidativos e um balanço mineral mais favorável sob condições estressantes de salinidade, seca e baixas temperaturas (GARG et al., 2002). Em tabaco, a expressão heteróloga do gene *AtTPS1* de *Arabidopsis* aumentou a tolerância a vários estresses abióticos, tais como, seca e temperatura (ALMEIDA et al., 2005), confirmando a importância desse transcrito na tolerância à seca.

A via de ubiquitinação media a modificação pós-traducional de proteínas celulares, normalmente marcando as proteínas para que sejam destruídas no proteossomo. Nesse processo, a ubiquitina, conjuga-se com os resíduos lisina das proteínas-alvo (MOON; PARRY; ESTELLE, 2004; SMALLE; VIERSTRA, 2004; DREHER; CALLIS, 2007). O sistema de ubiquitinação mostra-se presente em todas as células eucarióticas, estando implicado em muitos processos celulares, incluindo: diferenciação, divisão celular, respostas hormonais e resposta a estresses bióticos e abióticos (CHO et al., 2008). Cabe ressaltar que proteínas *E3 ubiquitin ligase*, do tipo *RING finger*, já foram descritas como responsivas à seca

em várias espécies vegetais, tais como: *Arabidopsis thaliana*, arroz, *Capsicum annuum*, milho e *Artemisia desertorum* (QIN et al., 2008; LIU et al.; 2008; LEE et al., 2009; HUAI; ZHENG; WANG, 2009; YANG et al., 2008).

A enzima *fructose biphosphate aldolase* (FBA) têm duas isoformas em plantas (FBA cloroplastidial e FBA citossólica) (LEBHERZ; LEADBETTER; BRADSHAW, 1984). A FBA cloroplastidial é uma enzima essencial no Ciclo de Calvin, visto que sua atividade gera metabólitos para a biossíntese de amido (SONNEWALD; LERCHL; ZRENNER-FROMMER, 1994). Por sua vez, a FBA citossólica faz parte da via biossintética da sacarose, catalisando a reação para produção de FBP. Muitos trabalhos têm descrito que a acumulação de mRNA de FBA em plantas aumenta em resposta a alta salinidade, e que a superprodução de FBA cloroplastidial em tabaco pode aumentar sua tolerância ao sal, através do aumento de prolina (YAMADA et al., 2000; ZHANG et al., 2003). No estudo de Fan, Zhang e Zhang (2009) o gene *SpFBA* foi clonado de *Sesuvium portulacastrum*, uma planta de mangue, e comprovou-se o seu envolvimento na resposta a estímulos abióticos, tais como água salina, NaCl, ABA e PEG, promovendo a habilidade de sobrevivência nessas condições. E, como durante a seca, também ocorre o estresse osmótico, assim como em condições salinas, pode-se supor que essa enzima também apresente importância na superação do déficit hídrico, uma vez que, no presente trabalho, apresentou maior expressão no genótipo tolerante do que no suscetível à seca.

Nas folhas do genótipo tolerante, tiveram uma expressão mais pronunciada os transcritos: *mediator complex subunit 13* (B3F), *translation initiation factor eIF-3* (B4F), *aquaporin nodulin MTN-3-related* (B5F), *ribosomal protein L1p/L10e* (B6F), *TCP transcription factor* (B7F), *ribosomal protein L11* (F2).

Os *mediator complex subunit 13* ou *MED13* são recrutados por ativadores transcricionais ou receptores nucleares para induzir a expressão gênica, possivelmente por meio da interação com a RNA polimerase II e promovendo a formação do complexo transcricional de pré-iniciação (RACHEZ; FREEDMAN, 2001). Alguns dos processos fisiológicos que as subunidades dos *mediator complex* regulam, incluem: resposta a estresses abióticos e bióticos, bem como controle do desenvolvimento, florescimento e fertilidade (KIM et al., 2011).

Os *translation initiation factors* (eIFs) são proteínas envolvidas na fase de iniciação da tradução. Eles funcionam na formação de um complexo com a subunidade ribossomal 40S e a *Met-tRNA*$_i$ chamado de complexo de pré-iniciação 43S (PIC), reconhecendo o cap 5' na estrutura do mRNA, recrutando o 43S, promovendo o escaneamento ribossomal do mRNA,

regulando o reconhecimento do códon de iniciação AUG, e unindo-se à subunidade ribossomal para criar o ribossomo 80S (MALYS; McCARTHY, 2011)

As proteínas *aquaporin nodulin MTN-3-related* têm sido descritas como aquaporinas do tipo proteínas intrínsecas a nodulinas (NIP) e são conhecidas por transportar moléculas de água e pequenos solutos através de membranas biológicas, sendo extremamente importantes para a tolerância à seca (QUIGLEY et al., 2001; LUU; MAUREL, 2005).

Em *Arabidopsis*, a família *TCP transcription factor* regula a expressão de *miR164,* um tipo de micro-RNA, que está envolvido com a regulação de genes responsivos à seca (ZHOU et al., 2013), sendo assim, a detecção desse transcrito nas folhas do genótipo tolerante, mostra que esse tipo de regulação gênica pode estar ocorrendo nesse genótipo, podendo ser um mecanismo importante de tolerância à seca.

3.3.4.2 Transcritos detectados preferencialmente no genótipo suscetível

Os TDFs que apresentaram bandas com maior intensidade no genótipo suscetível foram mais expressos nesse genótipo, não estando necessariamente relacionados com a tolerância à seca. Contudo, esse genótipo também apresentou alguns genes que lhe conferem a habilidade de suportar o déficit hídrico por um determinado período.

Nas raízes do genótipo suscetível, tiveram uma expressão mais pronunciada os transcritos: *carbonic anhydrase* (C1R), *dihydrodipicolinate reductase* (C5R), *S-adenosylmethionine synthetase* (R1), *coatomer protein complex* (R2), *zinc-finger domain of monoamine-oxidase A repressor R1* (R3), *cobalamin-independent methionine synthase* (R4), *synaptobrevin* (R10), *haloacid dehalogenase-like hydrolase* (R11), *ADP-ribosylation factor* (R12), *mTERF* (R14) e *serine protease S1C HtrA-related* (R15).

Guliyev, Bayramov e Babayev (2007) demonstraram que a atividade da enzima *carbonic anhydrase* aumenta durante o primeiro período de seca em folhas de genótipos tolerantes à seca, mas reduz no último estágio vegetativo.

A enzima *dihydrodipicolinate reductase* pertence à família de oxidorredutases, especificamente aquelas que atuam no grupo doador CH-CH com NAD^+ ou $NADP^+$ como aceptores e também participa da biossíntese de lisina (SCAPIN et al., 1997), não havendo relatos de seu envolvimento direto com a tolerância à seca.

A *S-adenosylmethionine* é uma substância essencial para as células vivas como grupo doador de metil e como precursor de etileno, poliamina e nicotianamina (MOFFATT; WERETILNYK, 2001).

Os *coatomer protein complex* são complexos de proteínas que revestem as membranas das vesículas de transporte. São conhecidos três tipos de coatômeros: (i) COPI: realiza o transporte retrógrado do complexo de Golgi para o cis-Golgi e retículo endoplasmático; (ii) COPII: realiza o tranporte do retículo endoplasmático para o cis-Golgi; (iii) Clatrina e suas adaptinas associadas: realiza endocitose na membrana plasmática e transporte do Complexo de Golgi para os lisossomos (SIMON et al., 2000). Esses complexos protéicos podem dar uma contribuição para que o genótipo suscetível supere o estresse, visto que estão envolvidos com vesículas de transporte, e, sob estresse, as células produzem uma maior quantidade de moléculas que devem ser transportadas para descarte nos lisossomos.

R1 é um repressor do fator de transcrição que inibe a expressão do gene *monoamine-oxidase A*. Cabe ressaltar que as células vegetais expressam *monoamine-oxidases*, as quais catalisam a oxidação das aminas secretadas e produzem peróxido de hidrogênio no processo. Esse H_2O_2 produzido é, então, usado pelas peroxidases da parede celular para a lignificação da mesma ou para defesa da planta (VERMA; SHARMA, 2010). Sendo assim, esse pode ser um importante mecanismo da planta para suportar estresses abióticos, pois com o aumento da expressão do repressor *R1*, também há um aumento na síntese de *monoamine-oxidase*, ativando possíveis respostas de defesa da planta.

A enzima *cobalamin-independent methionine synthase* catalisa a síntese do aminoácido metionina pela transferência de um grupo metil do metiltetrahidrofolato para a homocisteína (FERRER et al., 2004), não havendo relatos de seu envolvimento em nenhum mecanismo de tolerância à seca em plantas.

As proteínas *synaptobrevin* restauram parcialmente o tráfego e fornecem tolerância a concentrações letais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEVINE et al., 2001), mostrando sua relação com a superação do estresse oxidativo, que é bastante comum em plantas sob seca.

As enzimas *haloacid dehalogenase-like hydrolase* podem pertencer aos grupos das fosfatases (ZHANG et al.; 2004; ALLEN; DUNAWAY-MARIANO, 2004), ATPases (ARAVIND; GALPERIN; KOONIN, 1998; COLLET; VAN SCHAFTINGEN; STROOBANT, 1998) ou fosfomutases, também conhecidas como fosfotransferases (COLLET et al., 1998). É importante salientar que a adição/remoção do fosfato pode alterar os possíveis ligantes da superfície da proteína, sendo um mecanismo importante de sinalização celular, e fundamental no processo de montagem e desmontagem de complexos protéicos, o que torna evidente a importância dessas enzimas na resposta a estresses abióticos, como a seca, por exemplo.

Os *ADP-ribosylation factor* são membros da família *ARF* de proteínas de ligação a GTP. Essas proteínas apresentam múltiplas funções nas células vegetais, incluindo a regulação espacial do recrutamento de *coatomer protein complex* e elementos da matriz do Complexo de Golgi (MATHESON et al., 2007), agindo como reguladoras do tráfego vesicular e na remodelação da actina, e, portanto, auxiliando na superação do estresse.

A família de fatores mitocondriais de terminação da transcrição, tais como os *mTERF*, é requerida para a iniciação e terminação da transcrição na mitocôndria. Robles, Micol e Quesada (2012) indicaram uma função para os mTERFs na superação do estresse em plantas e, além disso, um mTERF de *Brassica napus* e seu ortólogo em *Arabidopsis* apresentaram superexpressão sob condições de estresse abiótico (DHAUBHADEL; KRISHNA, 2008).

As enzimas *serine protease S1C HtrA-related* são induzidas por choque térmico. Essas proteínas exibem um mecanismo de indução dependente de temperatura, atuando também no controle de qualidade das proteínas celulares (KIM; KIM, 2005). O aumento da síntese desse tipo de protease é necessário para o reparo de proteínas danificadas ou mal-dobradas, em decorrência do estresse, permitindo a manutenção da célula em funcionamento adequado por mais tempo.

Nos caules do genótipo suscetível, tiveram uma expressão mais pronunciada os transcritos: *S-adenosylmethionine synthetase* (C1C), *legume lectin* (C6C), *plant organelle RNA recognition* (C2) e *ribosomal protein L34e* (C7).

As proteínas *legume lectin* são uma classe de proteínas de ligação a carboidratos, encontradas nas plantas leguminosas, que desempenham funções em vários processos biológicos. Evidências sugerem o envolvimento dessas proteínas na regulação de estresses bióticos e abióticos. Cada membro da superfamília de genes, que codifica para essas proteínas, desempenha funções especializadas em uma condição específica de estresse (frio, seca, alta salinidade ou estresse biótico) (JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010).

As proteínas *plant organelle RNA recognition* (*PORR*), previamente conhecidas como *DUF860*, são um componente das partículas de ribonucleoproteínas dos íntrons grupo II nos cloroplastos. Elas são requeridas para o *splicing* dos íntrons com os quais se associam. Proteínas contendo esse domínio, por predição, localizam-se na mitocôndria ou cloroplasto (KROEGER et al., 2009). É importante ressaltar que a maior parte das proteínas *PORR* atua no metabolismo de RNA nas organelas (KONISHI; SUGIYAMA, 2006).

Nas folhas do genótipo suscetível, o transcrito *SWI/SNF-related chromatin binding* (C4F) teve uma expressão mais pronunciada. As proteínas *SWI/SNF-related chromatin binding* estão envolvidas com alterações epigenéticas. Como se sabe, a expressão do genoma

é dependente da estrutura da cromatina, a qual é governada por processos frequentemente associados com a regulação epigenética. Tanto sinais do desenvolvimento ou ambientais podem induzir modificações epigenéticas no genoma, e então, um único genoma numa célula vegetal, dá origem a múltiplos epigenomas em resposta a desafios próprios do desenvolvimento ou ambientais (ZHU, 2008). Tanto o ABA quanto a seca induzem a expressão do gene de remodelação da cromatina *Pisum sativum SNF5* (*PsSNF5*), o qual interage com as proteínas (*SWI3A* e *SWI3B*) de *Arabidopsis*, as quais, por sua vez, interagem com o regulador de florescimento FCA (SARNOWSKI et al., 2005; RIOS et al., 2007). Tanto o gene *SNF5*, induzido por ABA quanto o FCA regulam o tempo de florescimento e as respostas ao estresse através da remodelação da cromatina (CHINNUSAMY; ZHU, 2009), o que comprova a importância das proteínas *SWI/SNF – related chromatin binding* na superação de estresses.

3.3.4.3 Transcritos detectados em ambos os genótipos

A proteína *ribulose biphosphate carboxylase* (rubisco) está presente principalmente nos tecidos vegetais fotossintetizantes, contudo, seus transcritos (B4R e C6R) foram identificados nas raízes tanto do genótipo tolerante quanto do suscetível. Estudos relatam que o déficit hídrico em tomate (BARTHOLOMEW; BARTLEY; SCOLNIK, 1991), *Arabidopsis* (WILLIAMS; BULMAN; NEIL, 1994) e arroz (VU et al., 1999) leva a uma rápida redução na abundância dos transcritos da subunidade menor da rubisco, o que indica a redução da sua síntese. Porém, é importante ressaltar que a manutenção da atividade fotossintética sob a condição de seca, pode contribuir para a tolerância da planta. E, se esse transcrito apresentou uma expressão elevada nas raízes, provavelmente tenha apresentado uma expressão maior ainda nos tecidos fotossintetizantes, embora não tenha sido anotado nenhum transcrito dessa proteína em caules e folhas.

O transcrito *mitochondrial carrier protein*, cujos transcritos (B8R e R5) também foram identificados em raízes dos dois genótipos, é altamente representada nos genes responsivos ao estresse, sugerindo que o estresse induz necessidades diferentes para o transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial interna (VAN AKEN et al., 2009).

3.3.4.4 Análise da expressão dos transcritos (BAT 477 vs IAC-Carioca 80SH)

Através dos resultados obtidos, fica evidente que o genótipo tolerante (BAT 477) apresenta a ativação de muitos transcritos importantes para a tolerância à seca em plantas. Dentre os transcritos identificados nesse genótipo, podem ser listados, no mínimo 11, com potencial para serem usados em trabalhos futuros de transformação genética, sendo eles: *chlorophyll A-B binding protein*, *HSP40*, *HSP70*, *glycosyl hydrolase*, *serine/threonine protein kinase*, *trehalose-6-phosphate synthase*, *E3 ubiquitin ligase*, *fructose biphosphate aldolase*, *mediator complex subunit 13*, *aquaporin nodulin MTN-3-related* e *TCP transcription factor*.

O genótipo suscetível (IAC-Carioca 80 SH), também apresentou alguns transcritos que podem estar relacionados com a tolerância à seca, tais como: *coatomer protein complex*, *monoamine-oxidase A repressor R1*, *synaptobrevin*, *haloacid dehalogenase-like hydrolase*, *ADP-ribosylation factor*, *mTERF*, *serine protease S1C HtrA-related*, *legume lectin* e *SWI/SNF-related chromatin binding*. Embora esse genótipo seja considerado suscetível, ele apresenta alguns transcritos, relacionados à tolerância ao déficit hídrico, fato esse que certamente ocorreria com qualquer genótipo que tenha passado por melhoramento genético, visto que há uma seleção indireta para tolerância a estresses, sejam eles bióticos ou abióticos, quando são selecionadas as plantas mais produtivas no programa de melhoramento.

Mas, é evidente que o genótipo tolerante apresentou um número maior de transcritos que contribuem para a tolerância à seca do que o suscetível, e, esses transcritos têm uma participação em mecanismos de tolerância mais efetivos na superação do estresse.

3.3.4.5 Resposta sistêmica ao déficit hídrico

As plantas, de modo geral, adaptam-se à seca através de vários tipos de resposta nos níveis transcricional, pós-transcricional, traducional e pós-traducional, alguns dos quais envolvem a manutenção do balanço hídrico, a qual é mais eficiente nos genótipos tolerantes do que nos suscetíveis. Essas respostas são mediadas por vias de sinalização conservadas, resultando na indução de sistemas de detoxificação que controlam e reparam danos, modificam a alocação de água e regulam o crescimento, não somente nos tecidos atingidos, mas também de maneira sistêmica (Figura 16).

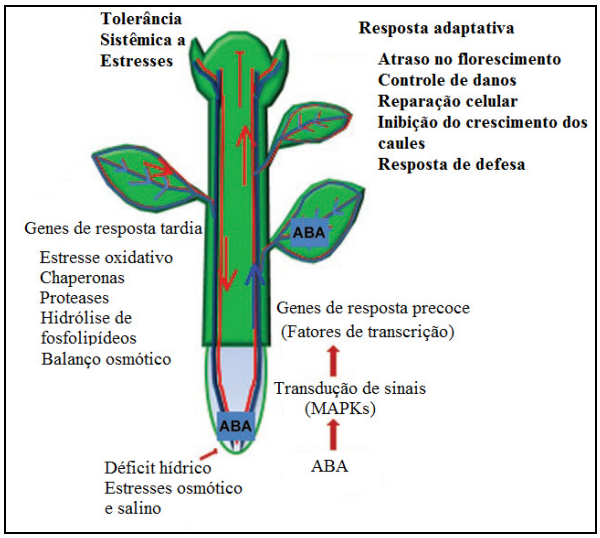

Figura 16 - Modelo de resposta sistêmica à seca em plantas. Adaptado de Montero-Tavera et al. (2008)

A resposta sistêmica ao estresse deve-se, em grande parte, à função sinalizadora desempenhada pelo ácido abscísico (ABA), o qual é transportado através do fluxo transpiratório, desde as raízes até as folhas maduras, provocando o fechamento das células-guarda dos estômatos. Uma segunda resposta ocorre com a produção e liberação de outras moléculas sinalizadoras, responsivas ao ABA, as quais são transportadas via floema até o meristema apical, provocando a redução do crescimento da parte aérea em relação às raízes (RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE-CÁZARES; KRAGLER, 2004).

Sendo assim, a seca é percebida inicialmente pelas raízes, o que provoca a síntese e o transporte de ABA através do xilema. O sinal mediado por ABA é transduzido através de uma rede de histidina-quinases e MAP quinases, resultando na expressão de genes de resposta precoce (TRAN et al., 2007). Os fatores de transcrição recém-sintetizados ativam os genes de resposta tardia, tais como chaperonas, proteases e proteínas em geral, envolvidas na manutenção do balanço osmótico, reduzindo os efeitos do estresse oxidativo (WALZ et al., 2004). Além disso, alguns dos genes induzidos por ABA ou pelos sinais secundários no tecido vascular, em resposta ao déficit hídrico, podem codificar para sinais móveis no floema, os quais podem ser transportados também para outros tecidos, protegendo-os do estresse e elicitando uma resposta adaptativa (LOUGH; LUCAS, 2006). Há evidências de que ao longo da evolução, a operação dessa rede de comunicação a longa distância foi positivamente selecionada, interconectando eficientemente os tecidos vegetais de maneira coordenada (LOUGH; LUCAS, 2006) e, provavelmente, essa rede seja mais eficiente nos genótipos tolerantes, os quais têm uma percepção e resposta ao estresse muito mais rápida do que os genótipos suscetíveis.

É importante ressaltar que outras proteínas e RNAs induzidos por déficit hídrico ou por condições que mimetizam esse estresse (ABA ou NaCl), também têm sido localizados no tecido vascular tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas (MONTERO-TAVERA; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE, 2008). Esses produtos gênicos pertencem a diferentes categorias funcionais, tais como: metabolismo geral, defesa, estresse oxidativo, fatores de transcrição, balanço hídrico e osmótico, maturação de sementes e também, funções desconhecidas. E, alguns desses genes também são elicitados por frio, sal e ataque de patógenos, sugerindo a presença de vias comuns para a resposta adaptativa a condições estressantes.

Diante do apresentado, fica evidente o quanto são complexos os diferentes mecanismos de resposta e tolerância à seca, tornando imprescindível a descoberta de um número cada vez maior de genes, para desvendar as intrincadas redes metabólicas afetadas pelos estresses abióticos, em especial o déficit hídrico.

2.3.5 Validação da técnica de cDNA-AFLP através de RT-qPCR

Nove transcritos, dentre aqueles isolados por *cDNA-AFLP*, foram selecionados para terem a sua expressão (indução ou repressão) validada por *RT-qPCR* (Figura 17). E, dentre os nove transcritos testados, somente três (33,3%) não foram validados por *RT-qPCR*, por não mostrarem significância estatística na direção esperada (indução ou repressão).

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a técnica de *cDNA-AFLP* apresenta um número bastante reduzido de falso-positivos, possibilitando seu uso para a descoberta de novos genes, contudo, quando for de interesse o uso desses genes para aplicações posteriores, tais como seleção assistida por marcadores ou transformação genética, é recomendado que seja realizada uma análise mais detalhada por *RT-qPCR*, a fim de validar os dados obtidos.

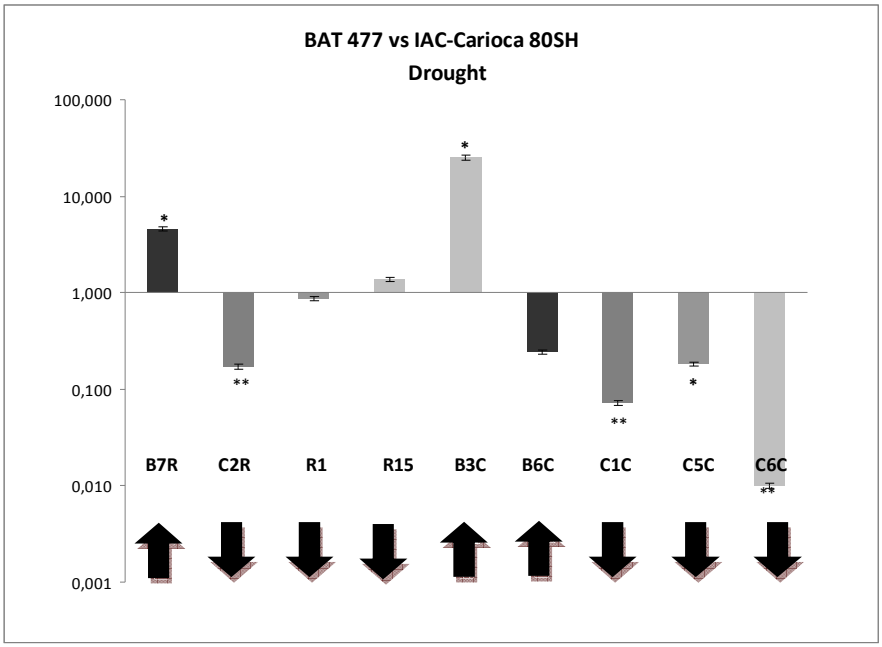

Figura 17 - Expressão relativa, por *RT-qPCR*, entre o genótipo tolerante e o suscetível, ambos sob seca. As setas indicam o resultado obtido pela técnica de *cDNA-AFLP*. Setas para cima indicam indução, enquanto setas para baixo indicam repressão, sempre tomando o genótipo tolerante como referência

* diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$

** diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,01$

3.4 Conclusões

A comparação dos dois genótipos contrastantes quanto a tolerância à seca revelou não somente marcadores seguros, mas também as divergências e similaridades nas redes transcricionais, destacando genes-candidatos para uso em trabalhos futuros.

Referências

ACOSTA-DÍAZ, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; TREJO-LÓPEZ, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J.S.; AMADOR-RAMÍREZ, M. D. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress. **Agricultura Técnica en México**, Mexico, DF, v. 35, n. 4, p. 416-425, 2009.

ALLEN, K.N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 495-503, 2004.

ALMEIDA, A.M.; VILLALOBOS, E.; ARAÚJO, S.S.; LEYMAN, B.; VAN DIJCK, P.; ALFARO-CARDOSO, L.; FEVEREIRO, P.S.; TORNE, J.M.; SANTOS, D.M. Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. **Euphytica**, Wageningen, v. 146, n. 1, p. 165-176, 2005.

ALVAREZ, S.; MARSH, E.L.; SCHROEDER, S.G.; SCHACHTMAN, D.P. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 31, n. 3, p. 325-340, 2008.

ANDREWS, S.C.; GUEST, J.R. Nucleotide sequence of the gene encoding the GMP reductase of *Escherichia coli* K12. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 255, n. 1, p. 35-43, 1988.

ARAVIND, L.; GALPERIN, M.Y.; KOONIN, E.V. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 127-129, 1998.

BARTHOLOMEW, D.M.; BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Abscisic-acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 1, p. 291-296, 1991.

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**, New York, v. 31, n. 5, p. 827-838, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004.

BREYNE, P.; ZABEAU, M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 2, p. 136-142, 2001.

BROSCHÉ, M.; STRID, A. The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1445, n. 2, p. 342-344, 1999.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHINNUSAMY, V.; KAREN, S.; ZHU, J.K. Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 395, p. 225-236, 2004.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2009.

COLLET, J.F.; STROOBANT, V.; PIRARD, M.; DELPIERRE, G.; VAN SCHAFTINGEN, E. A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal D*X*D*X*(T/V) motif. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 23, p. 14107-14112, 1998.

COLLET, J.F.; VAN SCHAFTINGEN, E.; STROOBANT, V. A new family of phosphotransferases related to P-type ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 284, 1998.

CORTINA, C.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. **Plant Science,** Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 75-82, 2005.

DHAUBHADEL, S.; KRISHNA, P. Identification of differentially expressed genes in brassinosteroid-treated *Brassica napus* seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 27, n. 3, p. 297-308, 2008.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. Produção de feijão. In: FANCELLI, A.L. (Ed.). **Ecofisiologia e fenologia**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 23-48.

DREHER, K.; CALLIS, J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 787–822, 2007.

EVANS, S.J.; DATSON, N.A.; KABBAJ, M.; THOMPSON, R.C.; VREUGDENHIL, E.; DE KLOET, E.R.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Evaluation of Affymetrix gene chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 409-413, 2002.

FAN, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, n. 6, p. 975-984, 2009.

FERRER, J.L.; RAVANEL, S.; ROBERT, M.; DUMAS, R. Crystal structures of cobalamin-independent methionine synthase complexed with zinc, homocysteine, and methyltetrahydrofolate. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 43, p. 44235-44238, 2004.

FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, n. 1, p. 603-647, 2001.

FUKUMURA, R.; TAKAHASHI, H.; SAITO, T.; TSUTSUMI, Y.; FUJIMORI, A.; SATO, S.; TATSUMI, K.; ARAKI, R.; ABE, M. A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 16, p. e94, 2003.

GAO, J.; KIM, S.R.; CHUNG, Y.Y.; LEE, J.M.; AN, G. Developmental and environmental regulation of two ribosomal protein genes in tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, n. 5, p. 761-770, 1994.

GARG, A.K.; KIM, J.K.; OWENS, T.G.; RANWALA, A.P.; CHOI, Y.D.; KOCHIAN, L.V.; WU, R.J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 99, n. 25, p. 15898–15903, 2002.

GULIYEV, N.; BAYRAMOV, S.; BABAYEV, H. Effect of water deficit on rubisco and carbonic anhydrase activities in different wheat genotypes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS, 14., 2007, Glasgow. **Photosynthesis: energy from the sun; proceedings…** Glasgow: Springer, 2007, p.1465-1468.

GUO, L.; WANG, D.; MA, H.; YIN, W.; XIA, X. Complementary DNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP-cDNA) analysis of differential gene expression from the xerophytes *Ammopiptanthus mongolicus* in response to cold, drought and cold together with drought. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, Lagos, v. 10, n. 19, p. 3715-3725, 2011.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, London, v. 381, n. 7, p. 571-580, 1996.

HEDSTROM, L. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 109, n. 7, p. 2903-2928, 2009.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001.

HU, W.J.; HARDING, S.A.; LUNG, J.; POPKO, J.L.; RALPH, J.; STOKKE, D.D.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 8, p. 808-812, 1999.

HUAI, J.; ZHENG, J.; WANG, G. Overexpression of a new Cys2/His2 zinc finger protein ZmZF1 from maize confers salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 117-124, 2009.

JIANG, S.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 79-103, 2010.

KIM, K.Y.; PARK, S.W.; CHUNG, Y.S.; CHUNG, C.H.; KIM, J.I. Molecular cloning of low-temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 399, p. 1153-1155, 2004.

KIM, Y.J.; ZHENG, B.; YU, Y.; WON, S.Y.; MO, B.; CHEN, X. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 814-822, 2011.

KONISHI, M.; SUGIYAMA, M. A novel plant-specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1 is required for the maintenance of active cell proliferation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 2, p. 591-602, 2006.

KROEGER, T.S.; WATKINS, K.P.; FRISO, G.; VAN WIJK, K.J.; BARKAN, A. A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, n. 11, p. 4537-4542, 2009.

LEBHERZ, H.G.; LEADBETTER, M.M.; BRADSHAW, R.A. Isolation and characterization of cytosolic and chloroplastic forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 2, p. 1011–1017, 1984.

LEE, H.K.; CHO, S.K.; SON, O.; XU, Z.; HWANG, I.; KIM, W.T. Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plant. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 622-641, 2009.

LEMBKE, C.G.; NISHIYAMA JUNIOR, M.Y.; SATO, P.M.; ANDRADE, R.F.; SOUZA, G.M. Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. **Plant Molecular Biology,** Dordrecht, v. 79, n. 4, p. 461-477, 2012.

LEVINE, A.; BELENGHI, B.; DAMARI-WEISLER, H.; GRANOT, D. Vesicle associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 49, p. 46284-46289, 2001.

LI, H-W.; ZANG, B-S.; DENG, X-W.; WANG, X-P. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. **Planta**, Berlin, v. 234, n. 5, p. 1007-1018, 2011.

LI, L.; ZHOU, Y.; CHENG, X.; SUN, J.; MARITA, J.M.; RALPH, J.; CHIANG, V.L. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 100, n. 8, p. 4939–4944, 2003.

LIU, H.; ZHANG, H.; YANG, Y.; LI, G.; YANG, Y.; WANG, X.; BASNAYAKE, B.; LI, D.; SONG, F. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defence responses against abiotic and biotic stresses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 68, n. 1-2, p. 17-30, 2008.

LOUGH, T.J.; LUCAS, W.J. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 203-232, 2006.

LUDWIG, A.; TENHAKEN, R. Suppression of the ribosomal L2 gene reveals a novel mechanism for stress adaptation in soybean. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 6, p. 792-798, 2001.

LUU, D.T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2005.

MAGASANIK, B.; MOYED, H.S.; GEHRING, L.B. Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 3, p. 339-350, 1957.

MALYS, N.; McCARTHY, J.E.G. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, n. 6, p. 991-1003, 2011.

MAO, X.; ZHANG, H.; TIAN, S.; CHANG, X.; JING, R. TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 683-696, 2010.

MATHESON, L.A.; HANTON, S.L.; ROSSI, M.; LATIJNHOUWERS, M.; STEFANO, G.; RENNA, L.; BRANDIZZI, F. Multiple roles of ADP-ribosylation factor 1 in plant cells include spatially regulated recruitment of coatomer and elements of the Golgi matrix. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 4, p. 1615-1627, 2007.

MONTERO-TAVERA, V.; RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Systemic nature of drought-tolerance in common bean. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 3, n. 9, p. 663-666, 2008.

MOON, J.; PARRY, G.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, n. 12, p. 3181-3195, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry.** 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2005. 1119 p.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004.

PIMKIN, M.; MARKHAM, G.D. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, New York, v. 76, n. 1, p. 1-53, 2009.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; TRAN, L.P.; MARUYAMA, K.; KIDOKORO, S.; FUJITA, Y.; FUJITA, M.; UMEZAWA, T.; SAWANO, Y.; MIYAZONO, K.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, n. 6, p. 1693-1707, 2008.

QUIGLEY, F.; ROSENBERG, J.M.; SHACHAR-HILL, Y.; BOHNERT, H.J. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2001.

RIOS, G.; GAGETE, A.P.; CASTILLO, J.; BERBEL, A.; FRANCO, L.; RODRIGO, M.I. Abscisic acid and desiccation-dependent expression of a novel putative SNF5-type chromatin-remodeling gene in *Pisum sativum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, n. 6, p. 427-435, 2007.

ROBLES, P.; MICOL, J.L.; QUESADA, V. *Arabidopsis* MDA1, a nuclear-encoded protein, functions in chloroplast development and abiotic stress responses. **PLOS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e42924, 2012.

RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; KRAGLER, F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 7, p. 641-650, 2004.

SAEZ-VASQUEZ, J.; GALLOIS, P.; DELSENY, M. Accumulation and nuclear targeting of BnC24: a *Brassica napus* ribosomal protein corresponding to a mRNA accumulating in response to cold treatment. **Plant Science**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 35-46, 2000.

SARNOWSKI, T.J.; RÍOS, G.; JASIK, J.; SWIEZEWSKI, S.; KACZANOWSKI, S.; LI, Y.; KWIATKOWSKA, A.; PAWLIKOWSKA, K.; KOZBIAL, M.; KOZBIAL, P. SWI3 subunits of putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes play distinct roles during *Arabidopsis* development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, n. 9, p. 2454-2472, 2005.

SATO, Y.; SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A.; FUKUDA, H. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 141-147, 1995.

SATOH, H.; UCHIDA, A.; NAKAYAMA, K.; OKADA, M. Water-soluble chlorophyll protein in brassicaceae plants in a stress-induced chlorophyll-binding protein. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 9, p. 906-911, 2001.

SCAPIN, G.; REDDY, S.G.; ZHENG, R.; BLANCHARD, J.S. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate reductase in complex with NADH and the inhibitor 2,6-pyridine-dicarboxylate. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 36, n. 49, p. 15081-15088, 1997.

SHI, C.; CHAUDHARY, S.; YU, K.; PARK, S. J.; NAVABI, A.; MCCLEAN, P. E. Identification of candidate genes associated with CBB resistance in common bean HR45 (*Phaseolus vulgaris* L.) using cDNA-AFLP. **Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 75-81, 2011.

SHIMON, G.; GAZALAH, S.; MARIEJEANNE, C.; TALEB, H.; MIZIED, F.N.; INBAL, Y.; CHEN, D.; MICHAL, B. Large-scale identification of leaf senescence associated genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 629-642, 2003.

SIEMENS, J.A.; ZWIAZEK, J.J. Changes in root water flow properties of solutions culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under different intensities of water-deficit stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 1, p. 44-49, 2004.

SIMON, J.P.; IVANOV, I.E.; ADESNIK, M.; SABATINI, D.D. *In vitro* generation from the trans-golgi network of coatomer-coated vesicles containing sialylated vesicular stomatitis virus-G protein. **Methods**, Orlando, v. 20, n. 4, p. 437-454, 2000.

SMALLE, J.; VIERSTRA, R.D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 555-590, 2004.

SONNEWALD, U.J.; LERCHL, R.; ZRENNER-FROMMER, W.B. Manipulation of source-sink relations in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 17, n. 5, p. 649-658, 1994.

STEWART, C. R. Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, n. 6, p. 792-794, 1971.

TRAN, L.S.; URAO, T.; QIN, F.; MARUYAMA, K.; KAKIMOTO, T.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 104, n. 51, p. 20623-20628, 2007.

TURNER, J.F.; KING, J.E. Inosine 5'-phosphate dehydrogenase of pea seeds. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 79, n. 1, p. 147-151, 1961.

VAN AKEN, O.; ZHANG, B.; CARRIE, C.; UGGALLA, V.; PAYNTER, E.; GIRAUD, E.; WHELAN, J. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 1310-1324, 2009.

VANDELEUR, R.; NIEMITZ, C.; TILBROOK, J.; TYERMAN, S.D. Roles of aquaporins in root responses to irrigation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1, p. 141-161, 2005.

VERMA, G.; SHARMA, S. Role of H_2O_2 and cell wall monoamine oxidases in germination of *Vigna radiata* seeds. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, New Delhi, v. 47, n. 4, p. 249-253, 2010.

VERVERIDIS, F.; TRANTAS, E.; DOUGLAS, C.; VOLLMER, G.; KRETZSCHAMAR, G.; PANOPOULOS, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. **Biotechnology Journal**, Weinhein, v. 2, n. 10, p. 1214-1234, 2007.

VINCENT, D.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; CORNIC, G.; NEGRONI, L.; ZIVY, M. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 3, p. 949-960, 2005.

VU, J.C.V.; GESCH, R.W.; ALLEN, L.H.; BOOTE, K.J.; BOWES, G. CO_2 enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, n. 1, p. 139-142, 1999.

WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of cucurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 12, p. 1795-1804, 2004.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 244-253, 2004.

WILLIAMS, J.; BULMAN, M.P.; NEILL, S.J. Wilt-induced ABA biosynthesis, gene-expression and down-regulation of rbcS messenger-RNA levels in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 2, p. 177-182, 1994.

YAMADA, S.; KOMORI, T.; HASHIMOTO, A.; KUWATA, S.; IMASEKI, H.; KUBO, T. Differential expression of plastidic aldolase genes in nicotiana plants under salt stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 61-69, 2000.

YANG, X.; SUN, C.; HU, Y.; LIN, Z. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 33, n. 1, p. 103-112, 2008.

ZHANG, G.; MORAIS, M.C.; DAI, J.; ZHANG, W.; DUNAWAY-MARIANO, D.; ALLEN, K.N. Investigation of metal ion binding in phosphonoacetaldehyde hydrolase identifies sequence markers for metal-activated enzymes of the HAD enzyme superfamily. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 43, n. 17, p. 4990-4997, 2004.

ZHANG, X.; LIN, C.; CHEN, H.; WANG, H.; QU, Z.; ZHANG, H.; YAO, J.; SHEN, D. Cloning of a NaCl-induced fructose-1,6-diphosphate aldolase cDNA from *Dualiella salina* and its expression in tobacco. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2003.

ZHOU, M.; LI, D.; LI, Z.; HU, Q.; YANG, C.; ZHU, L.; LUO, H. Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass. **Plant Physiology**, Rockville, v. 161, n. 3, p. 1375-1391, 2013.

ZHU, J.K. Epigenome sequencing comes of age. **Cell**, Cambridge, v. 133, n. 3, p. 395-397, 2008.

ZLATEV, Z.S.; LIDON, F.C.; RAMALHO, J.C.; YORDANOV, I.T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, n. 3, p. 389-394, 2006.

4 EXPRESSÃO GÊNICA ESPACIAL E TEMPORAL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM

Resumo

A maior parte dos processos celulares é catalisada por proteínas, sendo, portanto, essencial que as células realizem mudanças rápidas nos níveis de proteínas em resposta a qualquer tipo de estresse. Além disso, deve haver uma restrição espacial ou temporal da expressão gênica, a fim de evitar problemas decorrentes de uma expressão gênica inadequada. Esse trabalho teve por objetivo traçar os perfis de expressão gênica, de transcritos diferencialmente expressos em dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante (BAT 477) e o outro suscetível (IAC-Carioca 80SH) à seca, considerando tanto a expressão gênica espacial em três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas), quanto a temporal, em cinco coletas com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h após a indução do estresse), a fim de entender melhor quais transcritos são induzidos e/ou reprimidos em cada órgão, sob déficit hídrico, e se essa indução/repressão ocorre precoce, intermediária ou tardiamente com a imposição do estresse. Para isso foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, sendo induzido o déficit hídrico quando as plantas atingiram o estádio fenológico R_5. Foi então utilizada a técnica de *cDNA-AFLP* para isolar os transcritos diferencialmente expressos entre os dois genótipos, a qual, aliada ao sequenciamento e anotação, possibilitou a identificação e anotação de 45 transcritos, sendo selecionados 11 para a realização das análises de expressão gênica espacial e temporal por *RT-qPCR*. Dentre os transcritos analisados, aqueles que mais se destacaram para uso em trabalhos futuros de transformação genética, foram: *aquaporin nodulin MTN3*, *E3 ubiquitin ligase*, *serine/threonine protein kinase*, *glycosyl hydrolase* e *HSP 70*, uma vez que esses transcritos tiveram uma expressão bastante pronunciada no genótipo tolerante e são importantes para que a planta apresente tolerância à seca.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. PCR em tempo real. Expressão gênica espacial. Expressão gênica temporal.

Abstract

Most cellular processes is catalyzed by proteins, therefore, is essential that the cells carry out quick changes in protein levels in response to any type of stress. Furthermore, there must be a spatial or temporal gene expression restriction, in order to avoid problems arising from an inadequate gene expression. This study aimed to delineate the gene expression profiles of differentially expressed transcripts in two common bean genotypes, one tolerant (BAT 477) and one susceptible (IAC-Carioca 80SH) to drought, considering both the spatial gene expression in three organs (roots, stems and leaves) and temporal gene expression in five samples with increasing drought levels (24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after stress induction), in order to better understand the transcripts that are induced and/or repressed in each organ, under water stress, and if this induction/repression occurs early, middle or late with the stress imposition. For this, was conducted a green house experiment, with induced water deficit when plants reached growth stage R_5.Then, was used cDNA-AFLP technique to isolate transcripts differentially expressed between the two genotypes, which coupled with the sequencing and annotation, allowed the identification of 45 transcripts, of which 11 were selected for the spatial and temporal gene expression analyzes by RT-qPCR. Among the analyzed transcripts, those most outstanding for use in genetic transformation future works are: aquaporin nodulin MTN3, E3 ubiquitin ligase, serine/threonine protein kinase, glycosyl hydrolase and HSP 70, since these transcripts had a very pronounced expression in tolerant genotype and are important for the drought tolerance exhibited by plants.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Real-time PCR. Spatial gene expression. Temporal gene expression.

4.1 Introdução

Todos os organismos vivos devem responder e se defender contra os estresses ambientais, em especial as plantas, que são organismos sésseis e, portanto necessitam de uma maior habilidade de aclimatação do que os animais, visto que esses últimos podem migrar quando encontram situações desfavoráveis para o seu desenvolvimento.

Os estresses ambientais podem incluir: temperatura (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010), nível de oxigênio (hipoxia ou estresse oxidativo) (MAJMUNDAR; WONG; SIMON, 2010), deficiência de nutrientes (SENGUPTA; PETERSON; SABATINI, 2010) e seca (BARTELS, 2001). É importante lembrar que a habilidade de responder rapidamente a mudanças no ambiente celular é essencial para a sobrevivência, e há numerosas estratégias para lidar com o estresse ambiental nas células.

Embora todas as células de um organismo multicelular possuam o mesmo DNA, elas não expressam os mesmos genes em seus diferentes tecidos e órgãos. As células vegetais apresentam a capacidade de expressar genes diferentes em resposta a estímulos externos, ou internos. Portanto, ocorre constantemente uma regulação, tanto espacial quanto temporal, da expressão gênica (SPRIGGS; BUSHELL; WILLIS, 2010).

Há genes que são constitutivos, ou seja, se expressam em todas as células do organismo, e genes que são regulados ou induzidos de acordo com a necessidade do organismo em determinado momento. Os genes constitutivos, também conhecidos como *housekeeping genes*, codificam para proteínas que são essenciais para a manutenção da vida do organismo e normalmente estão envolvidos em processos básicos, tais como geração de energia, replicação e manutenção do material genético. Por sua vez, os genes regulados podem ser expressos em alguns tecidos ou órgãos, estando diretamente relacionados à função deles; ou ainda somente em um tecido, de função altamente especializada. A expressão induzida apresenta diversas características que a distingue da expressão dos genes constitutivos. Os genes induzidos são altamente regulados e devem ser ativados de forma rápida e específica em resposta a um estímulo. Uma vez que esse estímulo é removido, um gene induzido deve retornar rapidamente ao seu estado basal inativo (WEAKE; WORKMAN, 2010).

As células usam mecanismos de controle complexos e elaborados para controlar a expressão de cada gene, sendo que o controle da expressão gênica pode ocorrer em diferentes níveis: inicial, transcricional, de processamento, de transporte e estabilidade do mRNA,

traducional e pós-traducional (WEAKE; WORKMAN, 2010; KEENE, 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; ANDREOU; TAVERNARAKIS, 2009).

O controle em nível inicial é realizado basicamente pela cromatina, forma sob a qual o DNA é encontrado na célula. Para que ocorra o início da transcrição dentro da estrutura da cromatina, os fatores proteicos necessários para efetuar o processo devem ter acesso aos sítios promotores no DNA. Então, a posição de uma sequência de DNA na cromatina pode influenciar muito se essa sequência será transcrita ou silenciada. O acesso as regiões promotoras é restrito pela estrutura da cromatina, sendo muitas vezes, necessário o seu remodelamento. A acetilação das histonas reduz a compactação da cromatina, diminuindo a interação do *core complex* com o DNA, com isso os sítios promotores e reguladores ficam mais acessíveis para a ligação dos fatores de transcrição (HASSAN; NEELY; WORKMAN, 2001; HASSAN et al., 2002; CHANDY et al., 2006). A iniciação da transcrição é o ponto mais crítico do controle da expressão gênica, por esse motivo, genes eucarióticos possuem muito mais regiões regulatórias *upstream* do quadro aberto de leitura. Genes eucariotos não se organizam em operons, mas pode ser obtida uma regulação conjunta devido à presença de uma maior quantidade de sítios reguladores da iniciação da transcrição.

O controle em nível de processamento ocorre através do *splicing* e da adição da cauda *poli A*. O controle desta fase ocorre pela determinação de quais éxons presentes no mRNA precursor serão mantidos no mRNA funcional. Os sítios de poliadenilação alternativa e a seleção de éxons dão à célula mais flexibilidade, pois um mesmo gene pode codificar polipeptídios diferentes.

O controle em nível de transporte do mRNA é realizado por enzimas que identificam se o mRNA está maduro ou não. Caso esteja imaturo, sua passagem do núcleo para o citoplasma é bloqueada. Já a estabilidade do mRNA depende de um balanço entre sua taxa de síntese e de degradação.

O controle da expressão gênica no nível traducional é particularmente importante na resposta ao estresse, uma vez que possibilita uma rápida mudança no complemento de proteínas que são sintetizadas em uma célula, enquanto um novo mRNA é transcrito e processado (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009), juntamente com a reprogramação da síntese de proteínas para obter uma resposta que seja relevante para o tipo de estresse que foi induzido.

No nível de controle pós-traducional ocorre o transporte, o processamento e a degradação de proteínas mal-dobradas ou não-funcionais.

Diante do exposto, o principal objetivo desse trabalho foi traçar os perfis de expressão gênica, de transcritos diferencialmente expressos em dois genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo um tolerante e um suscetível à seca, considerando tanto a expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) quanto a temporal (cinco coletas com níveis crescentes de déficit hídrico – 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), a fim de entender melhor quais transcritos são induzidos e/ou reprimidos em cada órgão e se essa indução/repressão ocorre precoce, intermediária ou tardiamente a partir da imposição de déficit hídrico.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal e indução dos genes de tolerância à seca

Nesse estudo foram utilizados dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante - BAT 477 (ACOSTA-DÍAZ et al., 2009) e o outro suscetível - IAC-Carioca 80SH (MONTERO-TAVERA; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE-CÁZARES, 2008). Os dois genótipos foram conduzidos em casa-de-vegetação sob potencial hídrico normal (ψw = -10 a -40 kPa) até atingirem o estádio fenológico R_5, caracterizado pela emissão dos botões florais. Após esse período, metade das plantas foram submetidas a condições de déficit hídrico entre ψ w = -41 a -50 kPa, por meio da suspensão da irrigação, e a outra metade continuou a ser irrigada normalmente.

Foram realizadas cinco coletas temporais (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) dos três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas) separadamente, a fim de realizar a extração de RNA total para cada tecido e coleta. Os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos, em *bulks* das repetições, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a maceração.

A partir das 60 amostras vegetais obtidas (2 genótipos x 3 órgãos vegetais x 2 condições de suprimento hídrico x 5 coletas temporais), foram conduzidas as extrações de RNA total, em triplicata, utilizando o reagente *Trizol*® (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade das amostras de RNA total foram estimadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, e sua integridade

foi verificada em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed*. Além disso, todas as amostras foram tratadas com *DNaseI* (*Fermentas*), seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.2 Técnica de cDNA-AFLP

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *SMARTer PCR cDNA Synthesis* (*Clontech Laboratories*), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de 15 amostras de RNA, sendo nove provenientes de plantas expostas a 72 horas de déficit hídrico e seus respectivos controles, como segue: (i) raízes de BAT 477 sob déficit hídrico; (ii) raízes de BAT 477 controle; (iii) caules de BAT 477 sob déficit hídrico; (iv) caules de BAT 477 controle; (v) folhas de BAT 477 sob déficit hídrico; (vi) folhas de BAT 477 controle; (vii) raízes de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico; (viii) caules de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico; (ix) folhas de IAC-Carioca 80SH sob déficit hídrico. E, as outras seis provenientes de *bulks* de RNA, extraídos de plantas expostas a cinco coletas temporais, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), como segue: (i) *Bulk* 1: raízes de BAT 477; (ii) *Bulk* 2: caules de BAT 477; (iii) *Bulk* 3: folhas de BAT 477; (iv) *Bulk* 4: raízes de IAC-Carioca 80 SH; (v) *Bulk* 5: caules de IAC-Carioca 80 SH; (vi) *Bulk* 6: folhas de IAC-Carioca 80 SH.

Os cDNAs foram digeridos usando o kit *AFLP CORE* (*Invitrogen*), adicionando 250 ng de cada amostra e seguindo as recomendações do fabricante.

Nas pré-amplificações foram usadas três diferentes combinações de iniciadores: *Eco*RI-A e *Mse*I-0, *Eco*RI-A e *Mse*I-A, *Eco*RI-A e *Mse*I-T. E, nas amplificações seletivas foram usadas seis diferentes combinações de iniciadores: *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0, *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A, *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-0, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-A, *Eco*RI-AGC e *Mse*I-T.

Aos produtos de amplificação seletiva, adicionou-se tampão de carregamento contendo formamida e realizou-se a desnaturação dos mesmos a 94°C por cinco minutos.

Foram preparados géis de poliacrilamida a 6% e, aproximadamente uma hora após a polimerização, as placas contendo o gel foram colocadas verticalmente dentro da cuba de eletroforese com tampão TBE 1X e foi realizada uma pré-corrida a 55 W por uma hora. As amostras desnaturadas foram aplicadas e colocadas para correr a 40 W por aproximadamente cinco horas. Após a eletroforese, foi realizada a revelação do gel com nitrato de prata.

Os fragmentos derivados dos transcritos (da sigla em inglês, TDFs) detectados nos géis de poliacrilamida como sendo diferencialmente expressos entre os genótipos tolerante e suscetível, foram excisados, reamplificados com o mesmo par de iniciadores usado para seu isolamento, purificados e clonados em *E. coli*, usando o vetor *pGEM-TEasy* (*Promega*). Foram sequenciados de 10 a 12 clones por TDF, a fim de realizar a anotação do TDF com base na sequência mais frequente. Para a análise da qualidade das sequências foi utilizada a base de dados *Ribosomal Database Project* (RDP), a qual realizou a trimagem das sequências, removendo as regiões da sequência correspondentes ao vetor, e, aceitando somente as bases com qualidade *Phred* maior que 20. As sequências com boa qualidade foram anotadas utilizando o genoma do feijoeiro comum, disponível na base de dados *Phytozome* (*http://www.phytozome.net*).

4.2.3 Expressão gênica espacial e temporal por RT-qPCR

Dentre os TDFs anotados, foram selecionados dez, para realizar a análise da expressão gênica espacial e temporal através de *RT-qPCR*, sendo também analisado o transcrito *DREB2C* (Tabela 8). A seleção dos TDFs foi baseada em sua expressão diferencial no gel de poliacrilamida, e, em seu potencial de contribuir para a tolerância à seca nas plantas. Já a seleção do transcrito *DREB2C* baseou-se no interesse de verificar a sua expressão gênica sob seca, embora ele não tenha sido detectado entre os TDFs sequenciados e anotados.

Para o desenho dos iniciadores, foi usado o programa Primer3, considerando como parâmetros: (i) temperatura de melting - Tm: mínima = 58ºC, ótima = 60°C e máxima = 62°C; (ii) tamanho do fragmento: entre 100 e 200 pb; (iii) tamanho do iniciador: mínimo = 18, ótimo = 20 e máximo = 22; (iv) conteúdo de GC: entre 50 e 60%.

Os genes de referência para esse estudo foram escolhidos com base no trabalho de Borges, Tsai e Caldas (2012), no qual foram comparados vários genes de referência com relação à sua estabilidade, em diferentes órgãos de feijoeiro comum sob estresse abiótico, indicando os genes Actina11 e β-Tubulina8 como os mais estáveis (Tabela 8).

A síntese de cDNA para as reações de *RT-qPCR* foi realizada usando o kit *Maxima®* *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese, foram utilizadas como molde, 60 amostras de RNA correspondentes aos três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas) dos dois genótipos (BAT 477 e IAC-Carioca 80SH) nas

cinco coletas temporais (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) em duas condições (sob seca e controle). As reações de *RT-qPCR* foram realizadas no equipamento *StepOne Plus*^{TM} *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

Tabela 8 - Sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os genes de referência e os genes-alvo, através de *RT-qPCR*

Transcrito	Anotação funcional	Sequência 5' – 3' (*Forward/Reverse*)	*Amplicon* (pb)
Act11	*Actin 11*	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	190
β-Tub8	*β-Tubulin 8*	AATGTGAAGTCCAGCGTGTG CTTCCCCAGTGTACCAATGC	163
DREB2C	*DREB2C*	CACCATGCACATGTTAGCGAAAG TTCATGGGAAGAAGGAGGGG	158
B7R	*Ribosomal protein S7e*	CCCGAAGGAGAGAAACAACA GCCTCTGCGACAGGATACTC	105
R8	*Aconitate hydratase*	ATACATACAACGCAATCACCCA GTAAGCATCCTTCACTCCGT	166
R15	*Serine protease family S1C HtrA-related*	GTTCCTATTCCTGGGGATGC AATCATGCCAATGCAACAGA	150
B1C	*HSP 70 protein*	TGATGAGTCCTGAGTAAGGTG CATGACCAAGAAACGCCTC	153
B3C	*Glycosyl hydrolase family 14*	TGGGAATTTCCTGGTATTGG GCCTGCGTCATCTGGTAGTT	117
B6C	*Serine-threonine protein kinase*	TGGAACGAGTGTGGTGAGTG TCTCCTCAACGTGGCTTTG	114
C1C	*S-adenosylmethionine synthase*	GGCTCGTCTCACTGAGGTTC TGGCACCCTTGTCATTGTAA	101
C6C	*Legume lectin domain*	AAGAACGCTCTTCAGGTCCA AACGCCGAGGTTCATATCAC	120
C5	*E3 ubiquitin ligase*	GATGAGTCCTGAGTAATCAACG TGACGAAGAATCAAGTATAGCC	176
B5F	*Aquaporin nodulin MTN3*	CATTTGGAGTCATTCAGATCGT CTAGTTGGTCTTCCTTCTTCTC	200

Os dados brutos liberados pelo *software* do equipamento foram processados no programa *LinReg PCR (11.0)*, o qual realiza a correção da baseline (fluorescência medida quando ainda não há amplificação do produto específico, o que inclui a fluorescência proveniente de cDNA, iniciadores e *SYBR Green* não-ligado) de cada amostra separadamente, determina a janela de linearidade (conjunto de pontos da fase exponencial, que é usado para determinar a eficiência da PCR por amostra) e usa a análise de regressão linear para ajustar uma linha reta ao longo dos dados da PCR. A partir do declive desta linha, a eficiência da PCR de cada amostra individual é calculada. A eficiência média por amplicon e o valor de Ct (número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência – fluorescência *threshold* ou Nt) por amostra são usados para calcular a concentração inicial por amostra, expressa em unidades arbitrárias de fluorescência. Cabe lembrar que amostras com maiores concentrações iniciais atingem o limiar de fluorescência mais cedo e apresentam, portanto, menor valor de Ct.

Após esse processamento inicial dos dados, foi usado o programa *REST 2009* (*QIAGEN*) para estimar a regulação da expressão gênica (positiva – indução ou negativa – repressão) para cada transcrito estudado, e também para determinar a significância estatística de cada valor de expressão relativa calculado. Esse programa aborda a medida da incerteza das razões de expressão, usando randomização e técnicas de *bootstrapping*. Essa análise da quantificação relativa da expressão gênica usa a expressão dos genes de referência para normalizar os níveis de expressão do gene de interesse em diferentes amostras. Esse método possibilita que os dados da PCR quantitativa sejam ajustados para compensar, por exemplo, variações devidas a diferenças na corrida da amostra. Além disso, aplica um modelo matemático que leva em conta as diferentes eficiências da PCR do gene de interesse e dos genes de referência, e, quando se usa mais de um gene de referência para a normalização, a confiabilidade dos resultados aumenta, por esse motivo, optou-se por utilizar dois genes de referência ao invés de um.

No programa *REST 2009* (*QIAGEN*) foram realizados quatro cálculos diferentes de expressão gênica relativa: (i) Razão BAT 477 seca / BAT 477 controle: fornece a expressão, do transcrito estudado, no genótipo tolerante exposto a déficit hídrico; (ii) Razão IAC-Carioca 80 SH seca / IAC-Carioca 80 SH controle: fornece a expressão, do transcrito estudado, no genótipo suscetível exposto a déficit hídrico; (iii) Razão BAT 477 controle / IAC-Carioca 80 SH controle: fornece o nível basal de expressão gênica, do transcrito estudado,

no genótipo tolerante comparado ao suscetível, ambos sob suprimento hídrico normal; (iv) Razão BAT 477 seca / IAC-Carioca 80SH seca: fornece a expressão gênica, do transcrito estudado, no genótipo tolerante comparado ao suscetível, ambos sob déficit hídrico.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Obtenção dos TDFs

Com base nos géis de poliacrilamida obtidos, foram selecionados dez TDFs para as análises de expressão gênica espacial e temporal, sendo eles: (i) TDF B7R: proveniente de cDNA, de raízes de plantas expostas a 72 h de déficit hídrico, amplificado seletivamente com os iniciadores *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0 (Figura 18a); (ii) TDFs R8 e R15: provenientes de cDNAs, de raízes de plantas expostas a cinco coletas, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), amplificados seletivamente, respectivamente com os iniciadores *Eco*RI-AAG e *Mse*I-A, *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T (Figura 18a); (iii). TDFs B1C, B3C, B6C, C1C e C6C: provenientes de cDNAs, de caules de plantas expostas a 72 h de déficit hídrico, amplificados seletivamente com os iniciadores *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0 (Figura 18b); (iv) TDF C5: proveniente de cDNA, de caules de plantas expostas a cinco coletas, com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h), amplificado seletivamente com os iniciadores *Eco*RI-AAG e *Mse*I-T (Figura 18b); (v) TDF B5F: proveniente de cDNA, de folhas de plantas expostas a 72 h de déficit hídrico, amplificadas seletivamente com os iniciadores *Eco*RI-AAG e *Mse*I-0 (Figura 18c).

Além dos dez TDFs selecionados com base nos géis de poliacrilamida, também foi analisado o transcrito *DREB2C*, a fim de verificar a sua expressão gênica tanto espacial quanto temporal, uma vez que esse transcrito é induzido por alta salinidade e alta osmolaridade (LEE et al., 2010), condições que frequentemente ocorrem em nível celular com a imposição de déficit hídrico.

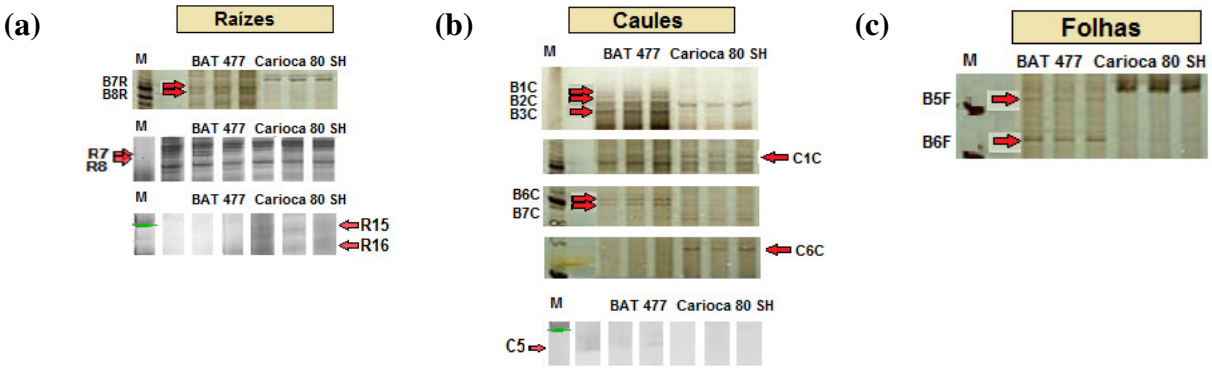

Figura 18 - Géis de poliacrilamida 6%, contendo os TDFs que foram excisados, sequenciados e tiveram suas sequências usadas para o desenho dos iniciadores, os quais foram utilizados para a amplificação por *RT-qPCR*. M: marcador molecular de 100 pb

4.3.2 Análise da expressão gênica espacial e temporal

A tolerância à seca depende de ajustes fisiológicos que ocorrem em diferentes órgãos vegetais, envolvendo a atuação recíproca de cascatas de sinalização/percepção, e supõe respostas integradas desde o nível molecular até a planta inteira. Os poucos estudos que têm comparado os transcritomas de folhas e raízes têm destacado que as respostas à seca são órgão-específicas (KREPS et al., 2002; ZHOU et al., 2007; BOGEAT-TRIBOULOT et al., 2007). As raízes sentem o déficit hídrico no solo, enviam sinais químicos aos caules, e a manutenção do crescimento das raízes, a despeito da redução da disponibilidade hídrica contribui para a tolerância à seca.

Com relação à expressão gênica temporal, cabe ressaltar que tanto as vias ABA-dependentes quanto as ABA-independentes induzem genes de resposta precoce, os quais por sua vez, ativam os genes efetores de tolerância ao estresse (XIONG; ZHU, 2002).

Dessa forma, a fim de compreender melhor quais transcritos são induzidos e/ou reprimidos em cada tecido e se essa indução/repressão ocorre precoce (24 h) intermediária (de 48 h a 96 h) ou tardiamente (120 h) foram apresentados quatro gráficos para cada transcrito em estudo. O primeiro gráfico (A) corresponde à expressão do transcrito, no genótipo tolerante, sob seca, possibilitando observar se houve indução ou repressão, nos três órgãos e nas cinco coletas. O segundo gráfico (B) também mostra se houve indução ou repressão do transcrito, sob seca, porém no genótipo suscetível. O terceiro gráfico (C)

apresenta o nível basal de expressão do transcrito no genótipo tolerante, ou seja, mostra se sob condições não-estressantes, esse genótipo apresenta um nível basal maior ou menor quando comparado ao genótipo suscetível, em cada um dos órgãos estudados. E, por último, o quarto gráfico (D) mostra se o genótipo tolerante, sob seca, apresenta aumento ou redução na expressão do transcrito com relação ao genótipo suscetível, nos três órgãos e nas cinco coletas.

4.3.2.1 Transcrito *DREB2C*

O genótipo tolerante, quando exposto à condição de seca, apresentou indução intermediária do transcrito *DREB2C* em caules e folhas (Figura 19A). Já o genótipo suscetível, apresentou indução precoce desse transcrito em raízes e caules; e intermediária em raízes (48 h e 96 h), caules e folhas; além de apresentar repressão intermediária nas raízes (72 h) e tardia em caules e folhas (Figura 19B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, o genótipo tolerante apresenta um nível basal maior de *DREB2C* nas raízes e menor nas folhas (Figura 19C). Já na condição de seca, o genótipo tolerante, ora apresenta um nível maior desse transcrito nos três órgãos estudados, ora apresenta um nível mais baixo (Figura 19D).

Os resultados obtidos sugerem que esse transcrito contribui mais para o genótipo suscetível do que para o tolerante propriamente dito, visto que é um fator de transcrição que desencadeia a expressão de vários genes relacionados à seca, e, portanto, é interessante que tenha uma expressão precoce, como pode ser visualizado em raízes e caules do genótipo suscetível, sob seca (Figura 13B).

Chen et al. (2007) mostraram que a expressão do gene *DREB2* de soja é induzida por seca, alta salinidade, baixa temperatura e tratamento com ABA. Além disso, a superexpressão de *DREB2* de soja em *Arabidopsis* transgênica ativa a expressão de genes *downstream*, resultando em um aumento da tolerância à seca e à alta salinidade, sem causar retardo no crescimento das plantas. A análise do conteúdo de prolina livre em tabaco transgênico também indicou que a superexpressão do gene *DREB2* de soja provocou um aumento dos níveis dessa proteína em plantas sob déficit hídrico.

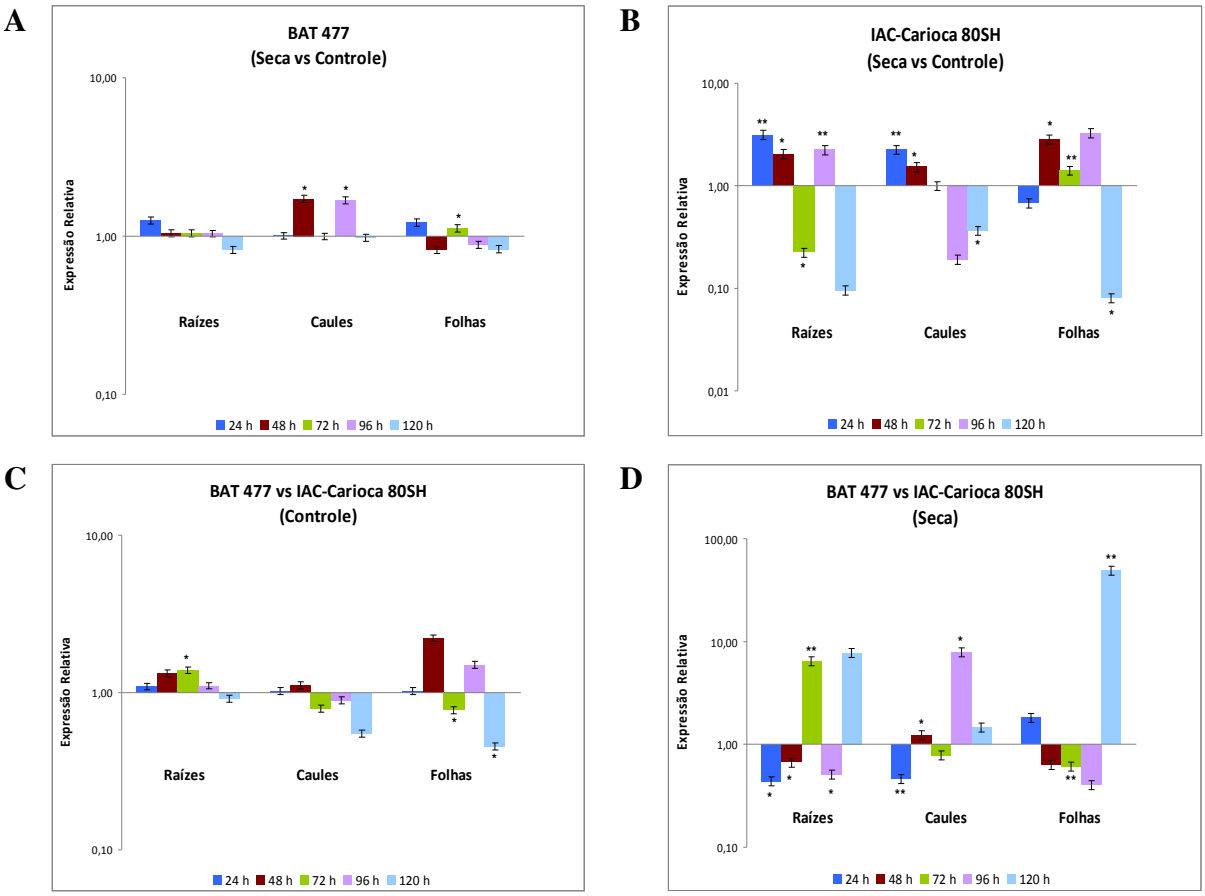

Figura 19 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito *DREB2C*

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

4.3.2.2 Transcrito B7R (*ribosomal protein S7e*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou repressão intermediária do transcrito B7R em raízes e folhas, e tardia nas raízes (Figura 20A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou indução precoce nas raízes, e intermediária em raízes e caules (72 h), havendo repressão intermediária em caules (96 h) e folhas, e tardia nos caules (Figura 20B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante tem um nível basal maior desse transcrito em raízes e folhas (Figura 20C). E, sob seca, o genótipo tolerante apresenta um nível maior desse transcrito nos três órgãos, possuindo um nível menor apenas nas raízes, com 96 h de déficit hídrico (Figura 20D).

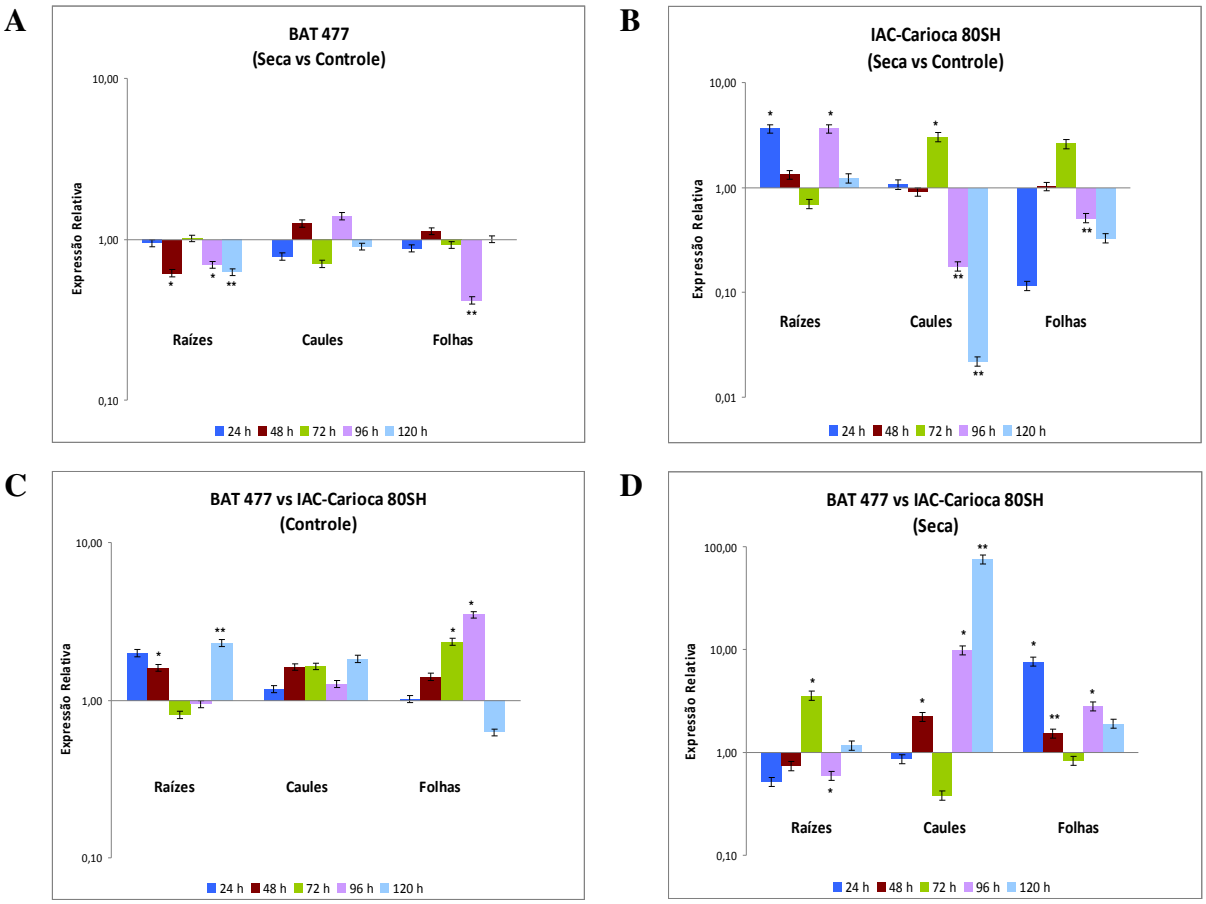

Figura 20 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B7R (*ribosomal protein S7e*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Díaz et al. (2010) relatam que os níveis dos transcritos de proteínas ribossomais são reduzidos, juntamente com o de proteínas translocases e da subunidade maior da rubisco, em plantas submetidas ao déficit hídrico, indicando também que a atividade cloroplastidial é substancialmente alterada em resposta à seca. Sendo assim, pode-se afirmar que o fato desse transcrito apresentar um nível basal mais elevado em raízes e folhas do genótipo tolerante, pode contribuir para as diferenças desse genótipo quando comparado ao suscetível, pois, apesar de ser reprimido no genótipo tolerante sob seca, ele ainda se mantém em níveis muito mais altos do que no suscetível, podendo indicar que a manutenção dos níveis desse transcrito, na condição de seca, pode ser um diferencial do genótipo tolerante para a superação do estresse.

4.3.2.3 Transcrito R8 (*aconitate hydratase*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução intermediária do transcrito R8 apenas nas raízes (96 h), contudo, houve repressão precoce em caules e folhas; intermediária em raízes (72 h) e folhas; e tardia nos três órgãos (Figura 21A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou apenas uma indução precoce nos caules, ocorrendo repressão precoce nas raízes, intermediária nos três órgãos e tardia nas folhas. (Figura 21B).

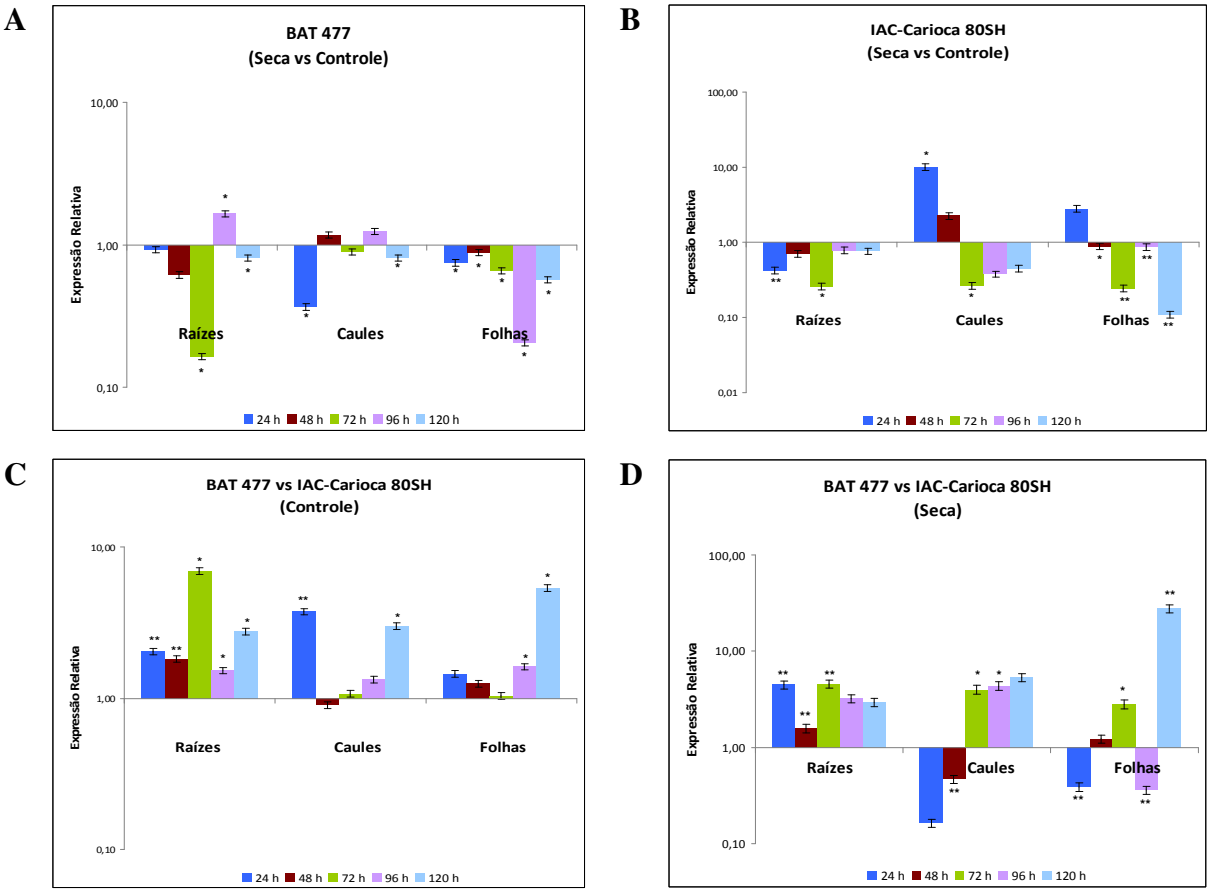

Figura 21 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito R8 (*aconitate hydratase*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, verifica-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal desse transcrito mais elevado do que o genótipo suscetível nos três órgãos (Figura 21C). Já na condição de seca, o genótipo tolerante apresenta um nível menor desse transcrito apenas nos caules (48 h) e nas folhas (24 h e 96h) (Figura 21D).

Lembke et al. (2012) também observaram a superexpressão da enzima *aconitate hydratase*, 72 h após a indução de seca em cana-de-açúcar. É importante lembrar que essa enzima isomeriza citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico, então, o maior nível basal desse transcrito no genótipo tolerante, sugere sua contribuição nos mecanismos de tolerância associados ao metabolismo de carboidratos nesse genótipo. Contudo, a repressão de transcritos dessa enzima em tomate selvagem leva ao aumento da taxa de assimilação de CO_2 e, portanto da síntese fotossintética da sacarose (CARRARI et al., 2003). Portanto, a indução desse transcrito, em resposta à seca, pode contribuir para a redução da fotossíntese em feijoeiro comum, devendo-se ter cautela no uso desse gene para fins de transformação genética.

4.3.2.4 Transcrito R15 (*serine protease S1C HtrA-related*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução intermediária do transcrito R15 nos caules, e tardia em caules e folhas; porém, houve repressão inicial nas raízes (Figura 22A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou indução intermediária desse transcrito em raízes e folhas (96 h); e tardia nos caules; contudo, houve repressão intermediária em caules e folhas (de 48 h a 72 h) (Figura 22B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal maior desse transcrito em raízes e caules, e um nível basal menor nas folhas (Figura 22C). E, quando exposto à seca, o genótipo tolerante apresenta um nível menor desse transcrito em raízes e em folhas (24 h), e um nível maior em caules e em folhas (72 h) (Figura 22D).

As proteínas da família *High temperature requirement A (HtrA)* e suas homólogas constituem um grupo de *serine proteases* induzidas por choque térmico (KIM; KIM, 2005). Depois que as proteínas são sintetizadas nas células, elas são expostas a uma grande variedade de estresses ambientais, incluindo: seca, calor, osmótico, químico; todos eles podendo causar danos às proteínas. Proteínas danificadas, em geral, tendem a acumularem-se ou agregarem-se, devido à perda das suas características de dobramento tridimensional apropriadas, bem como de sua atividade normal. Em tais casos, é necessário que essas proteínas sejam removidas, ou que elas retornem ao estado funcional, visto que proteínas agregadas podem prejudicar a viabilidade celular. Esse controle de qualidade das proteínas é essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos (GOTTESMAN; WICKNER; MAURIZI, 1997; WICKNER; MAURIZI; GOTTESMAN, 1999). As proteínas *HtrA/DegP*, chaperonas-

proteases ATP-independentes, são agentes-chave no controle de qualidade de proteínas no espaço periplasmático de bactérias gram-negativas (PALLEN; WREN, 1997; SPIESS; BEIL; EHRMANN, 1999), contudo, têm sido isoladas proteínas homólogas de *HtrA* em uma grande variedade de espécies, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas, plantas e mamíferos (KIM; KIM, 2005).

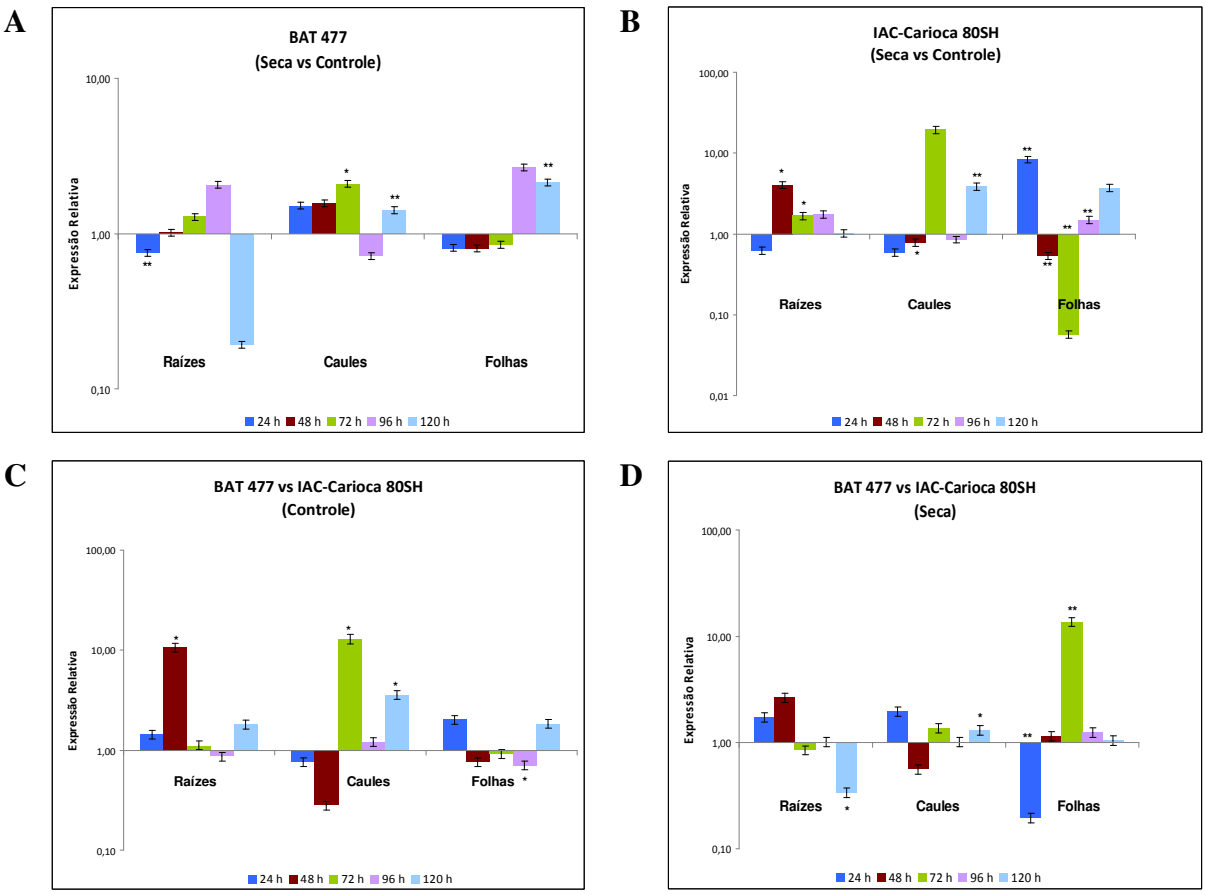

Figura 22 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito R15 (*serine protease S1C HtrA-related*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Conforme os resultados apresentados, o genótipo suscetível apresenta uma maior indução desse transcrito, com a imposição de seca, principalmente nas raízes. Isso provavelmente ocorre porque esse genótipo apresenta um menor número de genes que podem lhe conferir tolerância à seca, sendo assim, os processos de manutenção da homeostase celular são menos efetivos nesse genótipo do que no tolerante, fazendo com que um número maior de

proteínas sofra danos em sua estrutura tridimensional, tornando necessário o aumento da síntese de proteases *HtrA* para o reparo dessas proteínas e a manutenção da célula em funcionamento adequado por mais tempo, mesmo sob estresse.

4.3.2.5 Transcrito B1C (*HSP 70 protein*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução do transcrito B1C em todas as coletas nas raízes, já nos caules houve indução apenas inicial, e nas folhas inicial e intermediária; havendo repressão intermediária nos caules, e tardia em caules e folhas (Figura 23A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou indução tardia nas raízes, e repressão precoce e intermediária nesse mesmo tecido (Figura 23B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal desse transcrito mais baixo nas raízes e mais alto nos caules (Figura 23C). Já, sob seca, o genótipo tolerante apresenta um nível maior em raízes (de 24 h a 72 h), caules e folhas (de 24 h a 48 h) e um nível menor em raízes e folhas, ambas com 120 h de déficit hídrico (Figura 23D).

As chaperonas HSP 70 são requeridas no reconhecimento de proteínas mal-dobradas e na marcação das mesmas para a sua remoção, além disso, elas detêm a sua agregação ou auxiliam em seu redobramento na forma nativa, em um estado funcional (ELLIS; HARTL, 1999; GETHING; SAMBROOK, 1992). Cinco chaperonas moleculares, *DnaK/HSP70*, *DnaJ/HSP40*, *GrpE*, *HSP60* e *peptidil-prolil isomerase*, fazem parte do proteoma mínimo do estresse. Essas proteínas ilustram a conservação evolucionária extraordinariamente forte dessa função celular e a importância das chaperonas moleculares durante o estresse (KÜLTZ, 2005). Além disso, diante da sua ampla ocorrência, sob condições estresssantes, elas são extensivamente utilizadas como bioindicadores de estresse ambiental em diferentes tipos de organismos e seu estudo tem se estendido de uma análise baseada apenas em laboratório para a fisiologia ecológica baseada em condições reais de campo (FEDER; HOFMANN, 1999).

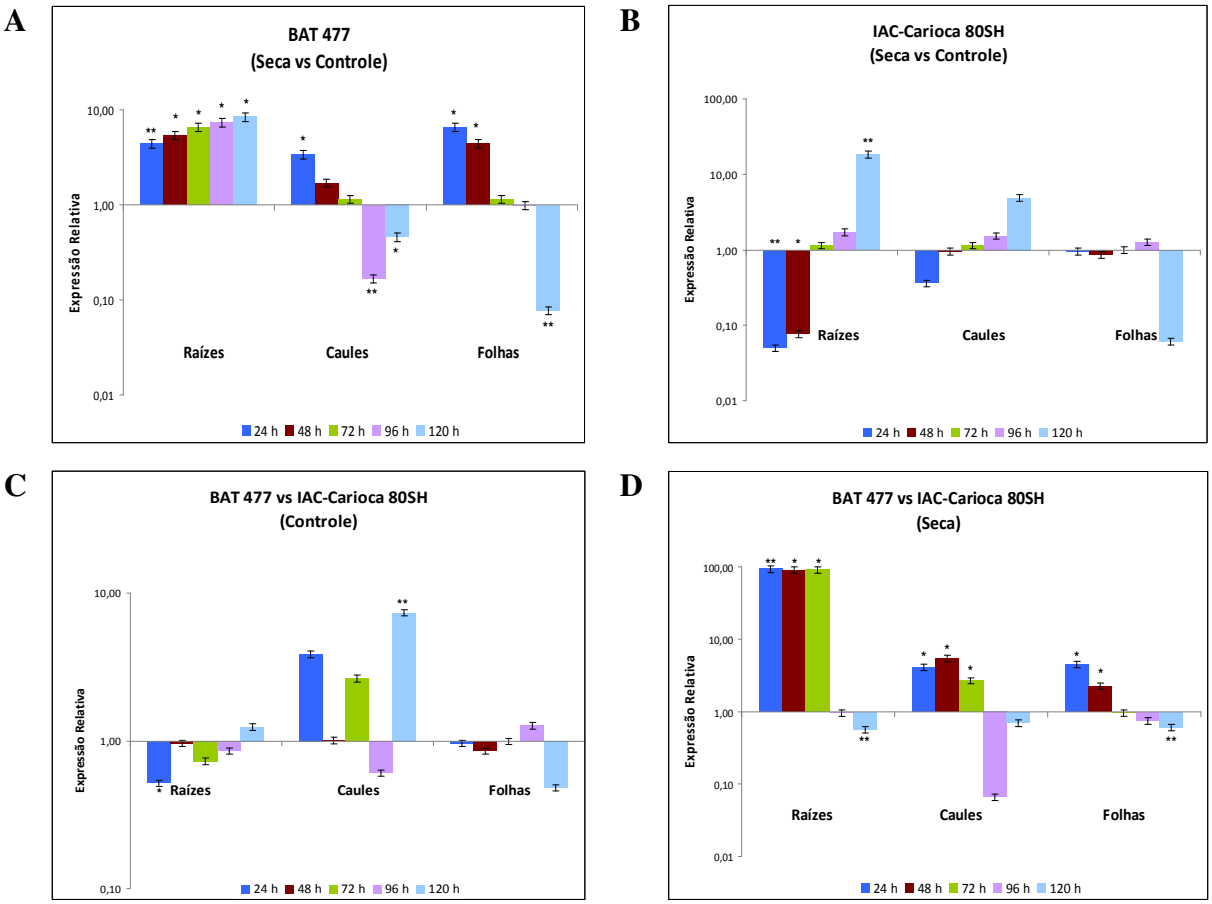

Figura 23 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B1C (*HSP 70 protein*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Os resultados obtidos comprovam que o genótipo tolerante apresenta uma expressão mais relevante dessas proteínas, o que o auxilia a superar o estresse de forma mais contundente do que o genótipo suscetível.

4.3.2.6 Transcrito B3C (*glycosyl hydrolase*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução precoce do transcrito B3C em raízes e caules, intermediária em caules e folhas (96 h), e tardia nas folhas; havendo repressão intermediária em raízes e folhas (48 h), e tardia nos caules (Figura 24A). Já o genótipo suscetível, apresentou indução precoce nos caules, intermediária em caules e folhas (72 h), e tardia nos caules, ocorrendo repressão precoce e tardia nas raízes, e intermediária nas folhas (48 h) (Figura 24B).

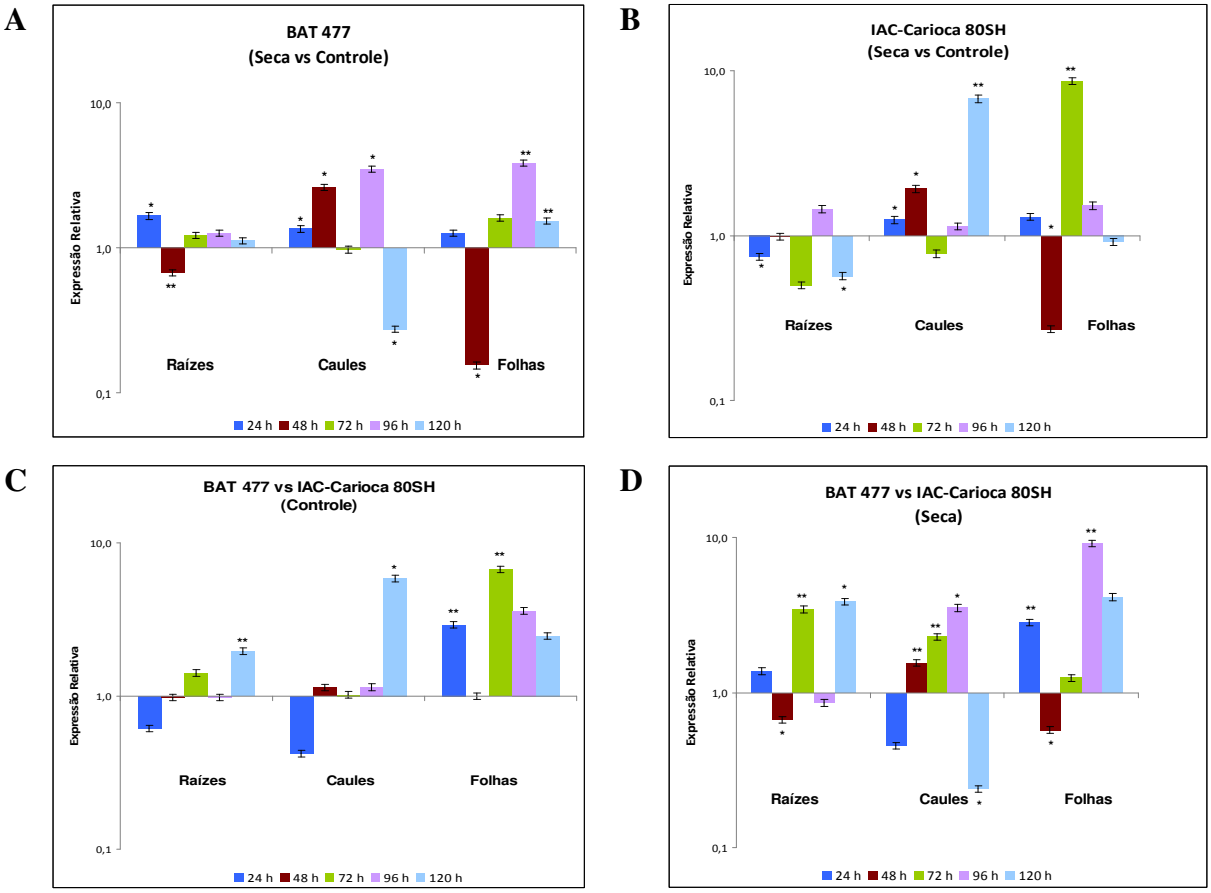

Figura 24 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B3C (*glycosyl hydrolase*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico normal, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal maior desse transcrito nos três órgãos (Figura 24C). E, sob seca, o genótipo tolerante quando comparado ao suscetível, apresenta um nível maior desse transcrito em raízes, caules e folhas, contudo, há um nível menor desse transcrito tanto nas raízes quanto nas folhas com 48 h e nos caules com 120 h de déficit hídrico (Figura 24D).

As enzimas *glycosyl hydrolase* hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos (BRAY, 2004). Elas são codificadas por um conjunto de genes, induzidos por ABA, que estão associados com a expansão celular. Então, a redução da expressão desse gene sob déficit hídrico está provavelmente associada com a redução da expansão celular, possivelmente relacionada à diminuição da pressão de turgor associada com esse tipo de

estresse (HUANG et al., 2008). Isso explica porque o genótipo tolerante apresenta uma expressão mais significativa desse transcrito do que o suscetível, visto que apresenta a manutenção do crescimento vegetal, e, portanto, da expansão celular, mesmo sob déficit hídrico, enquanto que o genótipo suscetível mostra redução do crescimento sob estresse.

4.3.2.7 Transcrito B6C (*serine/threonine protein kinase*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução precoce do transcrito B6C nas folhas e tardia nas raízes, mas, houve repressão intermediária nas raízes (Figura 25A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou apenas indução tardia desse transcrito nas folhas, ocorrendo repressão precoce nos caules, e intermediária e tardia nas raízes (Figura 25B).

Comparando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal maior desse transcrito nas raízes e um nível basal menor, tanto nos caules quanto nas folhas (Figura 25C). Já sob seca, o genótipo tolerante apresenta um nível maior do que o suscetível em raízes (48 h e 120 h) e em caules (72 h) e um nível menor em raízes (24 h), caules (96 h) e folhas (72 h) (Figura 25D).

Proteínas do tipo *serine/threonine protein kinase* já foram isoladas de trigo e apresentaram acumulação, tanto em embriões tratados com ABA, quanto em caules sob desidratação (INGRAM; BARTELS, 1996), o que comprova a importância da sua expressão aumentada, principalmente nos caules do genótipo tolerante sob déficit hídrico.

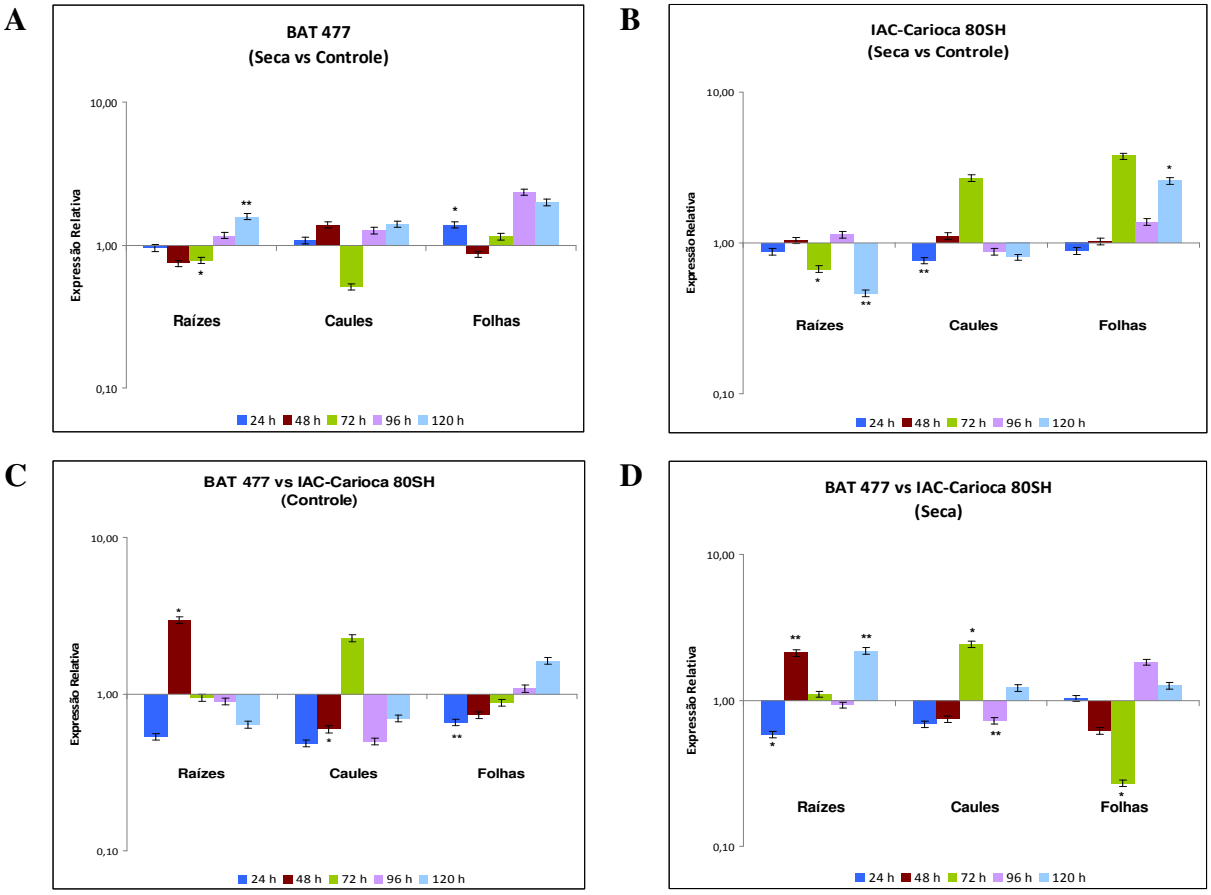

Figura 25 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B6C (*serine/threonine protein kinase*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

4.3.2.8 Transcrito C1C (*S-adenosylmethionine synthetase*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução precoce do transcrito C1C nos caules, intermediária nas raízes, e tardia nas folhas, havendo repressão precoce e intermediária nas raízes, e intermediária nos caules (Figura 26A). Já o genótipo suscetível, apresentou indução intermediária apenas nas folhas (96 h), contudo, houve repressão intermediária nos três órgãos vegetais, além de repressão tardia em raízes e folhas (Figura 26B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, constatou-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal desse transcrito maior nos caules e menor nas folhas (Figura 26C). E, sob seca, o genótipo tolerante apresenta um nível maior desse transcrito em raízes e folhas, e, um nível menor nos caules (Figura 26D).

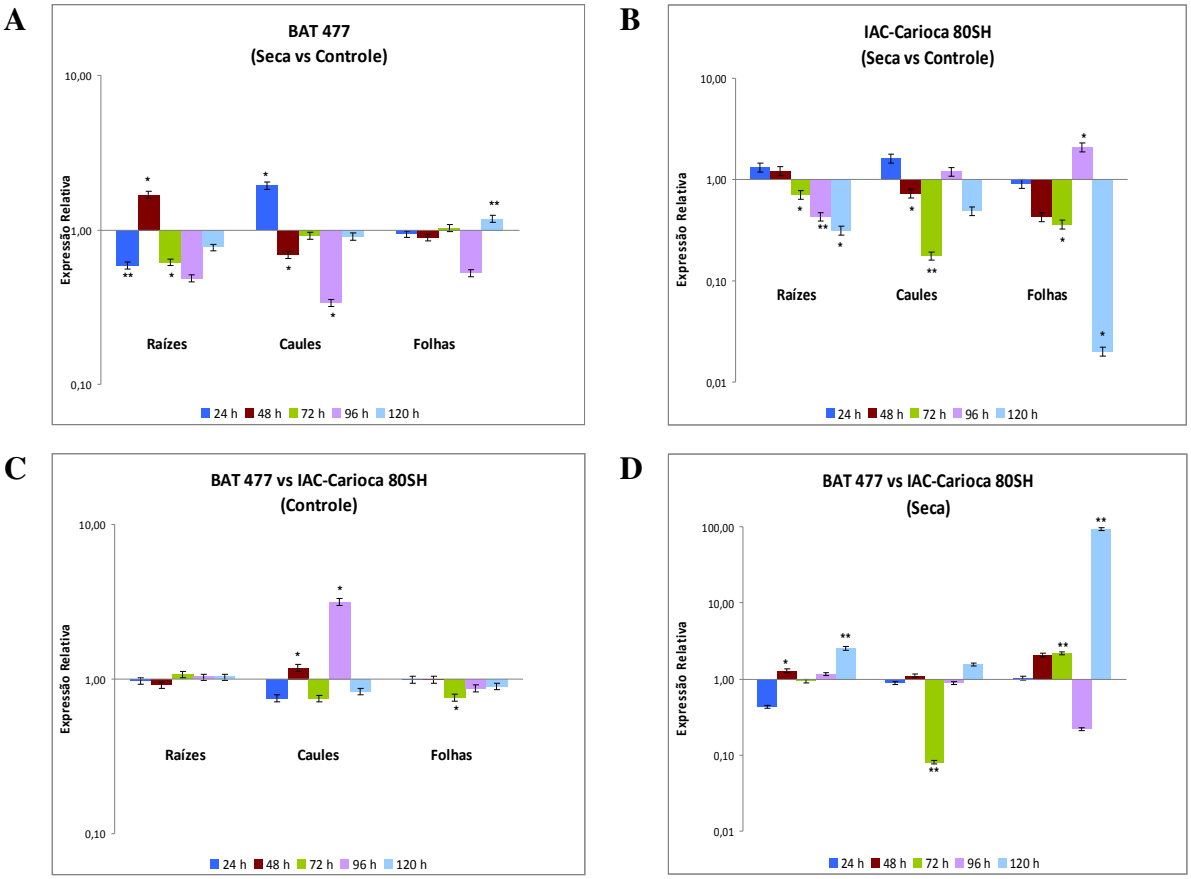

Figura 26 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C1C (*S-adenosylmethionine synthetase*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

É importante lembrar que o estresse ocasionado pela condição de seca causa alterações na composição química e nas propriedades físicas da parede celular, como a extensibilidade da parede, por exemplo, e, tais alterações podem envolver os genes que codificam para *S-adenosylmethionine synthetase*. Sob condições não-estressantes, a expressão aumentada dessa proteína está correlacionada com áreas onde a lignificação está ocorrendo (PELEMAN et al., 1989). Então, o aumento da expressão de *S-adenosylmethionine synthetase*

em tecidos submetidos a déficit hídrico também pode estar relacionada à lignificação da parede celular, pois, sabe-se que sob seca prolongada a elongação celular pára, e então, os processos de lignificação têm início (NONAMI; BOYER, 1990). E, como o genótipo suscetível apresenta uma maior sensibilidade à seca, esse processo de elongação celular pára mais cedo do que no genótipo tolerante, daí a maior produção de *S-adenosylmethionine synthetase* no genótipo suscetível.

4.3.2.9 Transcrito C6C (*legume lectin*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução do transcrito C6C nas folhas em todas as coletas, porém houve repressão precoce nas raízes e intermediária em raízes e caules (Figura 27A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou indução precoce desse transcrito nas folhas, intermediária em raízes (96 h) e caules e tardia nos três órgãos, havendo repressão intermediária em raízes (de 48 h a 72 h) e folhas (Figura 27B).

Comparando-se os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal bastante baixo desse transcrito quando comparado ao genótipo suscetível, nos três órgãos vegetais (Figura 27C). E, sob seca, esse nível basal baixo se mantém nos três órgãos e nas cinco coletas (Figura 27D).

As lectinas são uma classe de proteínas de ligação a carboidratos. Elas desempenham funções em vários processos biológicos. Há evidências de que os genes de lectina estejam envolvidos na regulação de estresses bióticos e abióticos (JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010). Cada membro dessa superfamília gênica desempenha funções especializadas em cada condição específica de estresse e funciona como um regulador de vários fatores ambientais, tais como frio, seca e alta salinidade, bem como estresses bióticos. Vários estudos têm mostrado que muitos genes de lectina exibem expressão diferencial sob vários estresses abióticos, incluindo temperatura, seca e alta salinidade (SPADORO-TANK; ETZLER, 1988; CAMMUE et al., 1989; SHAKIROVA; BEZRUKOVA; SHAYAKHMETOV, 1996; HIRANO et al., 2000; ZHANG et al., 2000; ABEBE; SKADSEN; KAEPPLER, 2005).

Esse parece ser um mecanismo de tolerância bastante importante para o genótipo suscetível, visto que ele possui uma menor quantidade de genes que lhe possibilitam superar o estresse quando comparado ao genótipo tolerante, e, evidentemente a indução desse transcrito no genótipo suscetível é absurdamente maior do que no tolerante.

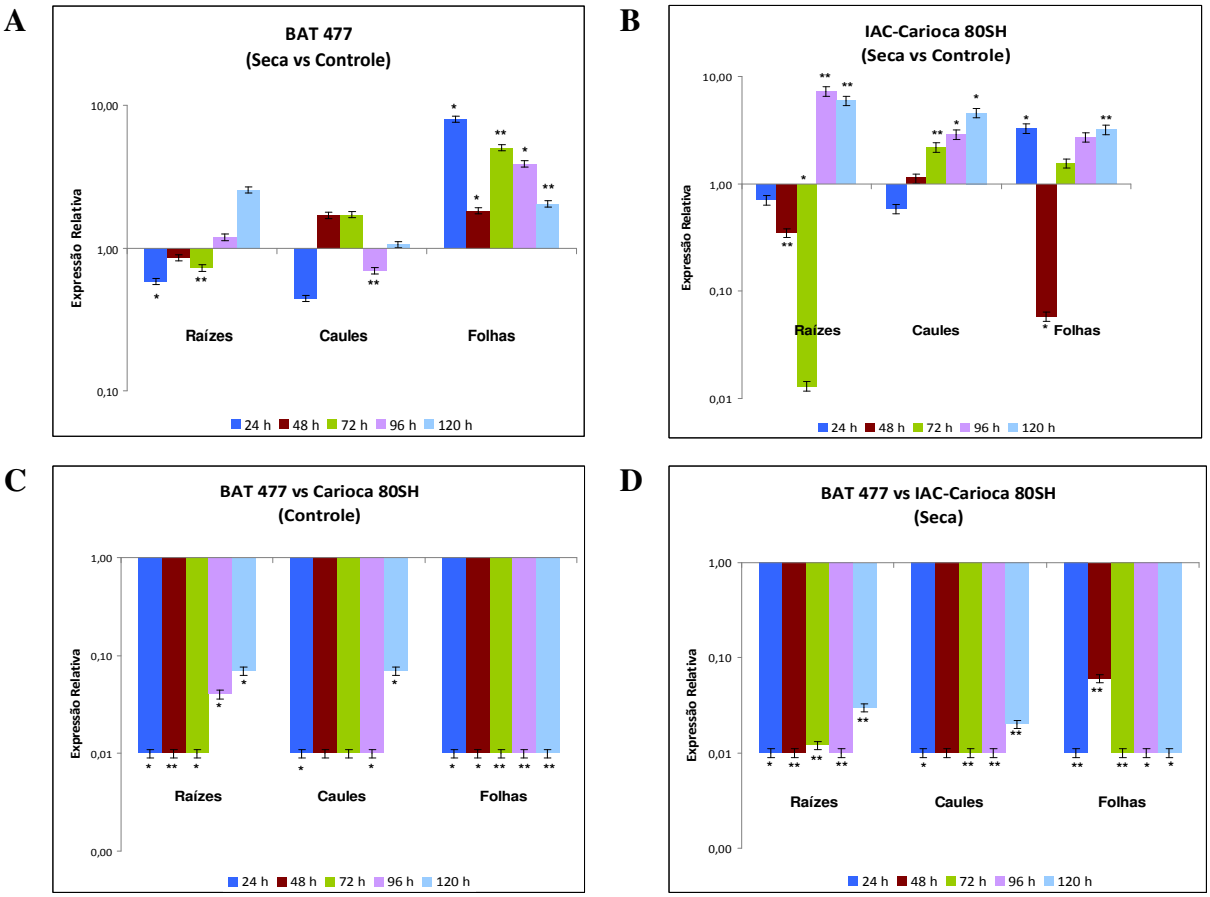

Figura 27 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C6C (*legume lectin*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

4.3.2.10 Transcrito C5 (*E3 ubiquitin ligase*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução precoce do transcrito C5 nas folhas, intermediária em raízes e folhas, e tardia nos caules (Figura 28A). O genótipo suscetível, por sua vez, apresentou somente indução tardia desse transcrito nas folhas, contudo, o reprimiu em raízes e em caules (Figura 28B).

Contrastando os dois genótipos, sob suprimento hídrico adequado, pode-se ver que o genótipo tolerante apresentou um nível basal maior desse transcrito nos três órgãos (Figura 28C), mantendo esse comportamento, mesmo sob seca (Figura 28D).

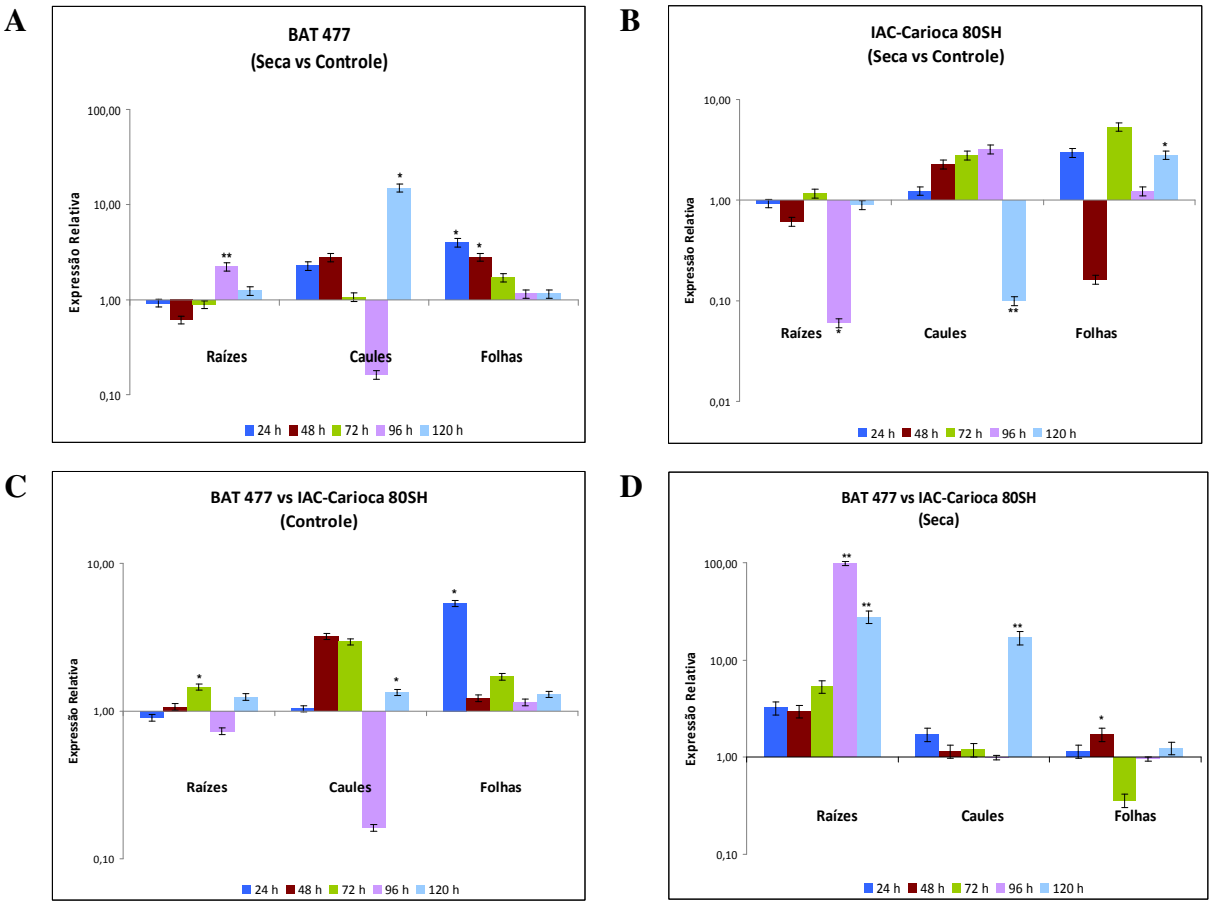

Figura 28 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito C5 (*E3 ubiquitin ligase*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

A ubiquitina apresenta como função marcar proteínas para destruição. Durante o déficit hídrico, resíduos de proteína podem ser modificados por processos químicos, tais como desaminação, isomerização ou oxidação (INGRAM; BARTELS, 1996), e, como já mencionado anteriormente, enzimas com funções no reparo de proteínas são superexpressas em resposta à seca. Como o genótipo tolerante provavelmente apresenta um sistema de reparação da célula sob estresse mais organizado do que o suscetível, ele apresenta uma maior produção de *E3 ubiquitin ligase*, a fim de destruir proteínas não-funcionais ou degradadas e, dessa forma, manter a homeostase celular.

4.3.2.11 Transcrito B5F (*aquaporin nodulin MTN3*)

O genótipo tolerante, sob seca, apresentou indução precoce do transcrito B5F nas raízes, intermediária em raízes, caules (96 h) e folhas, e tardia em raízes e folhas; havendo repressão precoce, intermediária (48 h) e tardia nos caules. (Figura 29A). Já no genótipo suscetível, houve indução precoce, intermediária e tardia nos três órgãos e repressão intermediária (48 h) nas raízes (Figura 29B).

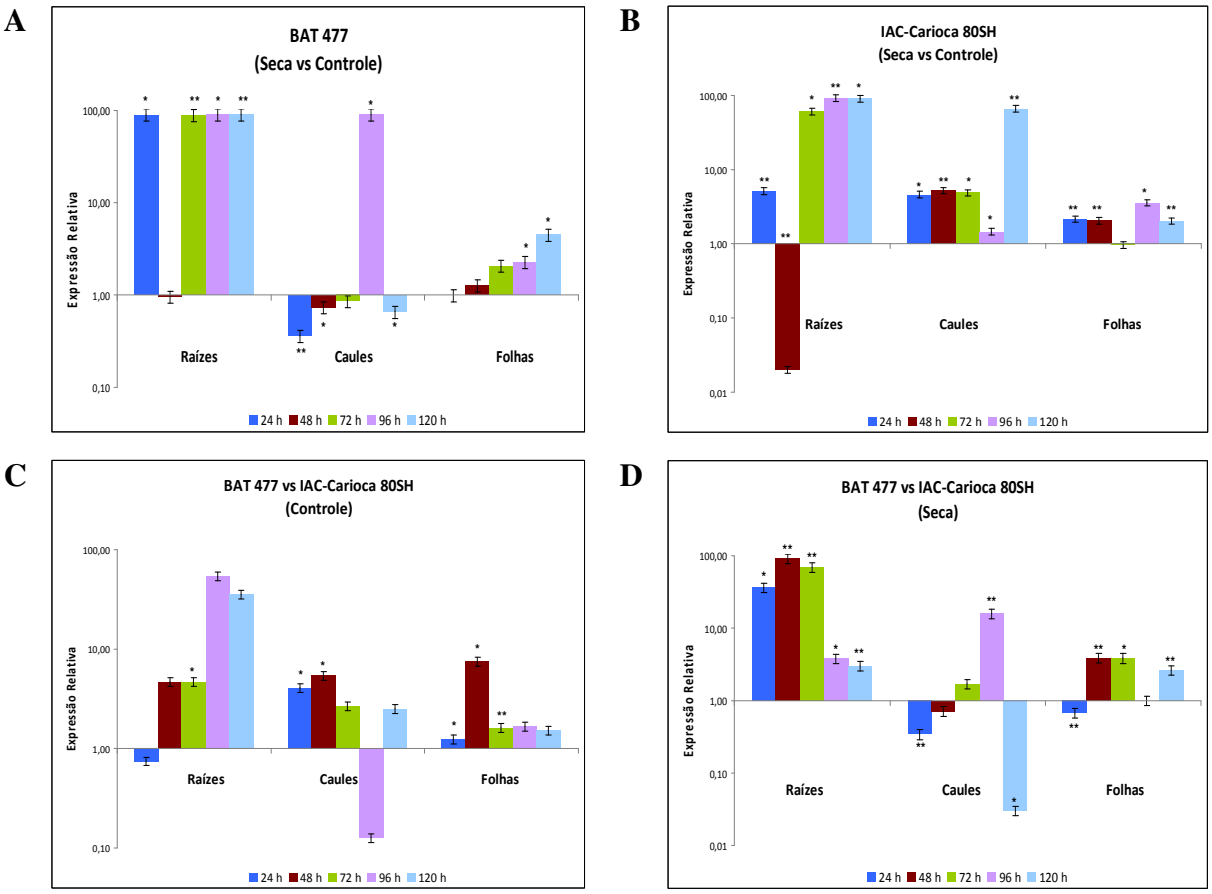

Figura 29 - Expressão gênica espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (com níveis crescentes de déficit hídrico) do transcrito B5F (*aquaporin nodulin MTN3*)

* expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.05$

** expressão relativa estatisticamente significativa, com $p < 0.01$

Comparando os dois genótipos sob suprimento hídrico adequado, observa-se que o genótipo tolerante apresenta um nível basal desse transcrito mais elevado do que o genótipo suscetível nos três órgãos estudados (Figura 29C). E, sob seca, o genótipo tolerante apresenta um nível maior desse transcrito nos três órgãos, havendo um nível menor apenas nos caules com 24 h e 120 h e nas folhas com 24 h de déficit hídrico (Figura 29D).

As aquaporinas são poros proteináceos que facilitam a difusão passiva de água através das membranas celulares (AROCA et al., 2006) e sua descoberta foi muito importante para a compreensão de como ocorre o fluxo de água através das membranas de células vegetais (MAUREL; CHRISPEELS, 2001; TYERMAN; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2002). Agora já se sabe que essas proteínas aumentam a permeabilidade das membranas celulares de 10 a 20 vezes e que a regulação da sua expressão e atividade é modulada por déficit hídrico (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003). Muitos genes que codificam para aquaporinas são superexpressos em *Arabidopsis* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI et al., 1992) e em *Craterostigma plantagineum* em resposta à seca ou ABA (RAMANJULU; BARTELS, 2002).

Com base na literatura e também nos resultados obtidos, é indiscutível a importância desse transcrito para a tolerância à seca, e, embora ele tenha sido isolado de folhas do genótipo tolerante, fica evidente que nas raízes a sua expressão é ainda mais proeminente, visto que as raízes são os órgãos que estão diretamente em contato com o solo, que nesse caso apresenta apenas uma pequena fração de água disponível, portanto, a indução desse transcrito, principalmente nas raízes, é imprescindível para a sobrevivência das plantas, sob a condição de seca.

4.4 Conclusões

A manutenção do equilíbrio hídrico é um processo-chave no funcionamento da planta, e é ativamente regulado na planta como um todo em resposta a variações na disponibilidade de água. Devido às diferenças de sensibilidade à seca dos dois genótipos (BAT 477 e IAC-Carioca 80SH), a seca prolongada produziu dois estados fisiológicos contrastantes. Contudo, os resultados apresentados mostram claramente, através das respostas a nível transcricional, que ambos os genótipos perceberam o déficit hídrico como um fator estressante, nos três órgãos vegetais estudados.

Dentre os transcritos estudados, aqueles que mais se destacaram para uso em trabalhos futuros de transformação genética foram: *aquaporin nodulin MTN3*, *E3 ubiquitin ligase*, *serine/threonine protein kinase*, *glycosyl hydrolase* e *HSP 70 protein*, uma vez que tiveram uma expressão bastante pronunciada no genótipo tolerante e são genes importantes para que a planta apresente tolerância à seca.

Referências

ABEBE, T.; SKADSEN, R.W.; KAEPPLER, H.F. A proximal upstream sequence controls tissue-specific expression of *Lem2*, a salicylate-inducible barley lectin-like gene. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 2, p. 170-183, 2005.

ACOSTA-DÍAZ, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; TREJO-LÓPEZ, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J.S.; AMADOR-RAMÍREZ, M. D. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress. **Agricultura Técnica en México**, Mexico, DF, , v. 35, n. 4, p. 416-425, 2009.

ANDREOU, A.M.; TAVERNARAKIS, N. SUMOylation and cell signaling. **Biotechnology Journal**, Weinhein, v. 4, n. 12, p. 1740-1752, 2009.

AROCA, R.; FERRANTE, A.; VERNIERI, P.; CHRISPEELS, M.J. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in Phaseolus vulgaris plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 1301-1310, 2006.

BARTELS, D. Molecular mechanisms of desiccation tolerance in plants. In: STOREY, K.B. (Ed.). **Molecular mechanisms of metabolic arrest**: life in limbo. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2001. p. 187-196.

BOGEAT-TRIBOULOT, M.B.; BROSCHE, M.; RENAULT, J.; JOUVE, L.; LE THIEC, D.; FAYYAZ, P.; VINOCUR, B.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; TEICHMANN, T.; ALTMAN, A.; HAUSMAN, J.-F.; POLLE, A.; KANGASJÄRVI, J.; DREYER, E. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 2, p. 876-892, 2007.

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**, New York, v. 31, n. 5, p. 827-838, 2012.

BRAY, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2331-2341, 2004.

CAMMUE, B.P.; BROEKAERT, W.F.; KELLENS, J.T.; RAIKHEL, N.V.; PEUMANS, W.J. Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, n. 4, p. 1432-1435, 1989.

CARRARI, F.; NUNES-NESI, A.; GIBON, Y.; LYTOVCHENKO, A.; LOUREIRO, M.E.; FERNIE, A.R. Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 3, p. 1322-1335, 2003.

CHANDY, M.; GUTIERREZ, J.L.; PROCHASSON, P.; WORKMAN, J.L. SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 5, n. 10, p. 1738-1747, 2006.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, M.; WANG, Q.Y.; CHENG, X.G.; XU, Z.S.; LI, C.L.; YE, X.G.; XIA, L.Q.; MA, Y.Z. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, confered drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.

DÍAZ, P.; BETTI, M.; SÁNCHEZ, D.H.; UDVARDI, M.K.; MONZA, J.; MÁRQUEZ, A.J. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. **New Phytologist**, London, v. 188, n. 4, p. 1001-1013, 2010.

ELLIS, R.J.; HARTL, F.U. Principles of protein folding in the cellular environment. **Current Opinion in Structural Biology**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 102-110, 1999.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

GETHING, M.J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, London, v. 355, n. 6355, p. 33-45, 1992.

GOTTESMAN, S.; WICKNER, S.; MAURIZI, M.R. Protein quality control: triage by chaperone and proteases. **Genes and Development**, New York, v. 11, n. 7, p. 815-823, 1997.

HASSAN, A.H; PROCHASSON, P.; NEELY, K.E.; GALASINSK, S.C.; CHANDY, M.; CARROZZA, M.J.; WORKMAN, J.L. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. **Cell**, Cambridge, v. 111, n. 3, p. 369-379, 2002.

HASSAN, A.H.; NEELY, K.E.; WORKMAN, J.L. Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes. **Cell**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 817-827, 2001.

HIRANO, K.; TERAOKA, T.; YAMANAKA, H.; HARASHIMA, A.; KUNISAKI, A.; TAKAHASHI, H.; HOSOKAWA, D. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible *saIT* gene. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 41, n. 3, p. 258-267, 2000.

HUANG, D.; WU, W.; ABRAMS, S.R.; CUTLER, A.J. The relationship of drought-related gene expression in Arabidopsis thaliana to hormonal and environmental factors. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 11, p. 2991-3007, 2008.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 377-403, 1996.

JIANG, S.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 79-103, 2010.

KEENE, J.D. Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic acid. **Endocrinology**, Springfield, v. 151, n. 4, p. 1391-1397, 2010.

KIM, D.Y.; KIM, K.K. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 38, n. 3, p. 266-274, 2005.

KREPS, J.A.; WU, Y.J.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; WANG, X.; HARPER, J.F. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 4, p. 2129-2141, 2002.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 67, n. 1, p. 225-257, 2005.

LEE, S.-J.; KANG, J.-Y.; PARK, H.-J.; KIM, M.D.; BAE, M.S.; CHOI, H.-I.; KIM, S.Y. *DREB2C* interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 716-727, 2010.

LEMBKE, C.G.; NISHIYAMA JUNIOR, M.Y.; SATO, P.M.; ANDRADE, R.F.; SOUZA, G.M. Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. **Plant Molecular Biology,** Dordrecht, v. 79, n. 4, p. 461-477, 2012.

MAJMUNDAR, A.J.; WONG, W.J.; SIMON, C.M. Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 294-309, 2010.

MAUREL, C.; CHRISPEELS, M.J. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 135-138, 2001.

MONTERO-TAVERA, V.; RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Systemic nature of drought-tolerance in common bean. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 3, n. 9, p. 663-666, 2008.

NONAMI, H.; BOYER, J.S. Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 4, p. 1610-1619, 1990.

PALLEN, M.J.; WREN, B.W. The HtrA family of serine proteases. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 209-221, 1997.

PELEMAN, J.; BOERJAN, W.; ENGLER, G.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of Arabidopsis thaliana encoding S-adenosylmethionine synthetase. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 1, n. 1, p. 81-93, 1989.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation- induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 25, n. 2, p. 141-151, 2002.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. Life on the verge of death: the heat shock response revisited. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 253-266, 2010.

SENGUPTA, S.; PETERSON, T.R.; SABATINI, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 310-322, 2010.

SHAKIROVA, F.M.; BEZRUKOVA, M.V.; SHAYAKHMETOV, F. Effect of temperature shock on the dynamics of abscisic acid and wheat germ agglutinin accumulation in wheat cell culture. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 85-87, 1996.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 731-745, 2009.

SPADORO-TANK, P.J.; ETZLER, E.M. Heat shock enhances the synthesis of a lectin-related protein in Dolichus biflorus cell suspension cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 4, p. 1131-1135, 1988.

SPIESS, C.; BEIL, A.; EHRMANN, M. A temperature dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. **Cell**, Cambridge, v. 97, n. 2, p. 229-247, 1999.

SPRIGGS, K.A.; BUSHELL, M.; WILLIS, A.E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 3, p. 228-237, 2010.

TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 25, n. 2, p. 173-194, 2002.

WEAKE, V.M.; WORKMAN, J.L. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 6, p. 426-437, 2010.

WICKNER, S.; MAURIZI, M.R.; GOTTESMAN, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. **Science**, Washington, DC, v. 286, n. 5446, p. 1888-1893, 1999.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Nottinghan, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; KOIZUMI, M.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation to *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, n. 3, p. 217-224, 1992.

ZHANG, W.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ASTOUL, C.H.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; PROOST, P.; TRUFFA-BACHI, P.; JALALI, A.A.; VAN DAMME, E.J. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta**, Berlin, v. 210, n. 10, p. 970-978, 2000.

ZHOU, J.L.; WANG, X.F.; JIAO, Y.L.; QIN, Y.H.; LIU, X.G.; HE, K.; CHEN, C.; MA, L.G.; WANG, J.; XIONG, L.Z. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, n. 5, p. 591-608, 2007.

5 ANÁLISES *IN SILICO* DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM

Resumo

Nos últimos anos surgiram muitos repositórios de dados de microarranjos e de expressão gênica, particularmente para espécies-modelo, como a *Arabidopsis thaliana*. Nesse contexto, se destaca a plataforma *Genevestigator*, um aplicativo que disponibiliza resultados processados a partir de um amplo banco de dados, analisado por curadores e com controle de qualidade de microarranjos *Affymetrix*. Através da técnica de *cDNA-AFLP*, foram isolados 45 transcritos de dois genótipos de feijoeiro comum (um tolerante e um suscetível à seca), os quais foram sequenciados e 11 deles tiveram a sua expressão espacial (raízes, caules e folhas) e temporal (coletas com níveis crescentes de déficit hídrico – 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) detalhada através de *RT-qPCR*. Porém, devido ao fato de o feijão comum não ser uma espécie de fácil aplicação da genética reversa para explorar a funcionalidade de genes, além de não ter seu genoma totalmente anotado e nem uma experimentação tão extensa quanto a de *A. thaliana*, optou-se por realizar análises *in silico* da expressão gênica, dos transcritos que ainda não tiveram a sua expressão detalhada *por RT-qPCR* e também dos que já tiveram, a título de confirmação dos resultados obtidos. Essas análises *in silico* foram realizadas com os genes ortólogos de *A. thaliana*, na plataforma *Genevestigator*. Dessa forma, foram realizados quatro tipos de análise. Na análise da anatomia, ficou confirmada a importância dos transcritos isolados por *cDNA-AFLP*, nos mecanismos de resposta ao déficit hídrico em raízes, caules e folhas, tanto do genótipo tolerante quanto do suscetível ao déficit hídrico. Na análise da corregulação de genes, constatou-se que praticamente todos os transcritos apresentaram indução e/ou repressão em determinadas condições de déficit hídrico, comprovando que são realmente regulados por esse estresse abiótico. Na análise de agrupamento hierárquico, constatou-se que os transcritos *glycosyl hydrolase*, *mitochondrial carrier protein*, *trehalose-phosphatase* e *DREB2C* apresentaram um visível padrão de indução, enquanto que os transcritos *cobalamin-independent methionine synthase*, *chlorophyll A-B binding protein*, *SWI/SNF-related chromatin binding*, *TCP transcription factor*, *ribosomal protein L34e*, *dihydrodipicolinate reductase* e *carbonic anhydrase* apresentaram um padrão de repressão sob seca. E, finalmente, na análise *signature* constatou-se que dentre os transcritos que já tiveram a sua expressão gênica detalhada por *RT-qPCR*, os que tiveram uma maior similaridade de resposta em *A. thaliana* foram as proteínas *HSP70* e *glycosyl hydrolase*. Assim, através dessas análises foram identificados genes de feijoeiro comum que podem estar envolvidos com a resposta contra estresses abióticos, notadamente contra a seca.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Transcritômica. Bioinformática. Análise de expressão gênica.

Abstract

In recent years many microarray and gene expression data repositories have emerged, particularly for model species such as *Arabidopsis thaliana*. In this context, the Genevestigator platform stands out, which is an application that provides processed results from a large database, analyzed by curators and with Affymetrix microarrays quality control. Forty five transcripts from two common bean genotypes (a tolerant and a susceptible to drought) were isolated through cDNA-AFLP technique, which were sequenced and 11 of them had their spatial (roots, stems and leaves) and temporal (samples with increasing levels of drought - 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h) expression detailed by RT-qPCR. However, due to the fact that is not easy to apply reverse genetics to the common bean in order to explore genes' functionality, besides not having fully annotated genome nor experimental data so extensive as that of *A. thaliana*, we chose to perform *in silico* gene expression analysis for the transcripts that have not yet had their expression detailed by RT-qPCR and also for those who have had, as a confirmation of the results obtained. These *in silico* analyzes were performed with the *A. thaliana* orthologous genes in the Genevestigator platform. Thus, four types of analysis were performed. In the anatomy analysis, the importance of cDNA-AFLP isolated transcripts in water deficit response mechanisms in roots, stems and leaves was confirmed for both genotypes. In the genes co-regulation analysis, we found that virtually all transcripts showed induction and/or repression in certain water deficit conditions, proving that this is indeed regulated by abiotic stress. In hierarchical clustering analysis, we found that the transcripts glycosyl hydrolase, mitochondrial carrier protein, trehalose-phosphatase and *DREB2C* showed a characteristic pattern of induction, whereas transcripts cobalamin-independent methionine synthase, chlorophyll A-B binding protein, SWI/SNF-related chromatin binding, TCP transcription factor, ribosomal protein L34e, dihydrodipicolinate reductase and carbonic anhydrase had a conspicuous pattern of repression under drought. And finally, the signature analysis found that among the transcripts that have had their gene expression detailed by RT-qPCR, those who had a greater similarity of response in *A. thaliana* were HSP70 and glycosyl hydrolase. Thus, through these analyzes, common bean genes that may be involved in the response against abiotic stresses were identified, especially against drought.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Transcriptomics. Bioinformatics. Gene expression analysis.

5.1 Introdução

A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta, atuando em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos. Desempenha a função de solvente, por meio do qual, gases, minerais e outros solutos entram nas células e movem-se na planta. Tem, ainda, papel importante na regulação térmica da planta, agindo tanto no resfriamento como na manutenção e distribuição do calor (NEUMAIER; NEPOMUCENO, 1994).

A seca é o principal fator abiótico responsável pela perda de rendimento no feijoeiro comum. Então, o desenvolvimento de plantas geneticamente tolerantes pode minimizar os danos causados pelo déficit hídrico nessa cultura, além de maximizar o rendimento, mesmo em condições de suprimento hídrico inadequadas. Para isso, é imprescindível compreender os mecanismos pelos quais as plantas reconhecem o déficit hídrico, bem como as alterações moleculares que ocorrem após essa percepção do estresse, uma vez que a seca em plantas não é uma característica simples, mas sim um complexo de mecanismos que trabalham em conjunto para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico.

Assim, a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca em plantas são cruciais no desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes. A expressão diferencial de genes, ainda não identificados em genótipos tolerantes, pode ser usada para o estudo desses mecanismos de tolerância (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico representa, na verdade, combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (BRAY, 1993). Portanto, entender como esses eventos interagem entre si será um passo importante no desenvolvimento de maior tolerância à seca.

Entretanto, como a tolerância à seca é uma característica poligênica e difícil de ser implementada no melhoramento genético clássico, poucos programas de melhoramento se preocupam com essa característica (BEEVER, 2000) e, dessa forma, têm sido desenvolvidas poucas cultivares tolerantes. Dessa maneira, a biologia molecular assume um papel-chave na identificação de genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, o que possibilita a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca, e torna viável o uso desses genes como marcadores moleculares em programas de melhoramento. Além disso, há a possibilidade de utilizá-los para a transformação genética de plantas, transferindo os genes de interesse para outros genótipos, e também para outras espécies de plantas (BEEVER, 2000).

Como os recursos genômicos e genéticos são escassos para o feijoeiro comum, a análise do transcritoma pode ser uma forma mais rápida, efetiva e com baixos custos para encontrar genes regulados diferencialmente sob estresse, levando à caracterização das respostas de defesa da planta. Sequências de cDNA são recursos úteis para o mapeamento de genes expressos (GARCIA et al., 2011; HANAI et al., 2010), bem como para o fornecimento de dados para comparações com espécies relacionadas, tais como soja (McCONNELL et al., 2010) e *Arabidopsis* (MELOTTO et al., 2005).

Cabe ressaltar que o sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis* foi concluído no ano 2000, o que possibilitou a monitoração da expressão gênica em escala genômica usando microarranjos. A disponibilidade do genoma completo e do sistema *Affymetrix,* levou ao amplo uso da tecnologia de *GeneChip* em plantas. Milhares de microarranjos foram processados, dos quais um número significativo se tornou publicamente disponível, através de serviços e repositórios tais como o *Nottingham Arabidopsis Stock Centre Transcriptomics* (NASCArrays) (CRAIGON et al., 2004), *ArrayExpress* do *European Bioinformatics Institute* (EBI) (BRAZMA et al., 2003) ou *Gene Expression Omnibus* (GEO) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002).

Além disso, a exploração de conjuntos de dados de expressão gênica em larga escala, provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Escherichia coli*, tem levado à descoberta de estruturas globais que governam redes metabólicas e regulatórias em uma ampla gama de organismos (LEE et al., 2002; RAVASZ et al., 2002; STELLING et al., 2002; IHMELS; LEVY; BARKAI, 2004). Comparações múltiplas do genoma também têm produzido observações interessantes de modularidade e conectividade na distribuição de dados de expressão gênica (BERGMANN; IHMELS; BARKAI, 2004). E ainda, a plataforma *Affymetrix* fornece um sistema padronizado com um alto grau de reprodutibilidade (HENNIG et al., 2003; REDMAN et al., 2004).

Nesse contexto de análise de dados de expressão gênica, se destaca o *Genevestigator,* que compreende um banco de dados de expressão gênica com determinadas análises de funcionalidade desenvolvidas para facilitar a descoberta de genes funcionais. Essa plataforma permite que os dados sejam apresentados no contexto do desenvolvimento da planta, dos órgãos vegetais e das condições ambientais, tanto para genes individuais quanto para famílias de genes. O principal objetivo dessa plataforma é atribuir uma informação contextualizada aos dados de expressão gênica, direcionando o desenho de novos experimentos e a descoberta de genes funcionais (ZIMMERMANN et al., 2004).

Diante do exposto, esse estudo teve como principal objetivo realizar uma análise *in silico* detalhada da expressão gênica de 45 transcritos, isolados por meio da técnica de *cDNA-AFLP*, a partir de dois genótipos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo um tolerante e o outro suscetível à seca, por meio da plataforma *Genevestigator*, a fim de identificar possíveis processos e vias metabólicas envolvidos na resposta do feijoeiro comum ao déficit hídrico.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Obtenção das sequências dos transcritos

Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, com dois genótipos de feijoeiro comum, sendo um tolerante ao déficit hídrico - BAT 477 (ACOSTA-DÍAZ et al., 2009) e o outro suscetível - IAC-Carioca 80SH (MONTERO-TAVERA; RUIZ-MEDRANO; XOCONOSTLE-CÁZARES, 2008), sendo induzido o déficit hídrico quando as plantas atingiram o estádio fenológico R_5, sendo realizadas cinco coletas com níveis crescentes de déficit hídrico - 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h após a indução do estresse (para maiores detalhes vide item 3.2.1). Após a coleta do material vegetal e extração de RNA (vide item 3.2.3), procedeu-se à técnica de *cDNA-AFLP* (vide item 3.2.4).

Os fragmentos derivados dos transcritos (da sigla em inglês, TDFs) detectados nos géis de poliacrilamida como sendo diferencialmente expressos entre os genótipos de feijoeiro comum tolerante e suscetível, foram excisados, reamplificados com o mesmo par de iniciadores usado para seu isolamento, purificados e clonados em *E. coli*, usando o vetor *pGEM-TEasy* (*Promega*). Foram sequenciados de 10 a 12 clones por TDF, a fim de comprovar a anotação do TDF, com base na sequência mais frequente. Para a análise da qualidade das sequências foi utilizada a base de dados *Ribosomal Database Project* (RDP), a qual realizou a trimagem das sequências, removendo as regiões da sequência correspondentes ao vetor, e, aceitando somente as bases com qualidade *Phred* maior que 20. As sequências com boa qualidade foram anotadas utilizando o genoma do feijoeiro comum, disponível na base de dados *Phytozome* (*http://www.phytozome.net*).

5.2.2 Estudo de expressão gênica espacial e temporal por *RT-qPCR*

Dentre os TDFs anotados, foram selecionados dez, para realizar a análise da expressão gênica espacial e temporal através de *RT-qPCR*, além do transcrito *DREB2C*, sendo utilizados como genes de referência: Actina11 e β-Tubulina8 (Tabela 9), ambos selecionados com base no estudo de Borges, Tsai e Caldas (2012). A seleção dos TDFs foi baseada em sua expressão diferencial no gel de poliacrilamida, e, em seu potencial de contribuir para a tolerância à seca nas plantas. Já a seleção do transcrito *DREB2C* baseou-se no interesse de verificar a sua expressão gênica sob seca, embora ele não tenha sido detectado dentre os TDFs sequenciados e anotados.

A síntese de cDNA foi realizada usando o kit *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*, de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese, foram utilizadas como molde, 60 amostras de RNA correspondentes aos três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas) dos dois genótipos (BAT 477 e IAC-Carioca 80SH) nas cinco coletas temporais (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) em duas condições (sob seca e controle). As reações de *RT-qPCR* foram realizadas no equipamento *StepOne Plus™ Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

Os dados brutos liberados pelo *software* do equipamento foram processados no programa *LinReg PCR (11.0)*. E, após o processamento inicial dos dados, foi usado o programa *REST 2009* (*QIAGEN*) para estimar a regulação da expressão gênica para cada transcrito estudado, e também para determinar a significância estatística de cada valor de expressão relativa. Nesse programa foram realizados quatro cálculos de expressão gênica relativa: (i) Razão BAT 477 seca / BAT 477 controle: fornece a expressão do transcrito no genótipo tolerante, sob déficit hídrico; (ii) Razão IAC-Carioca 80 SH seca / IAC-Carioca 80 SH controle: fornece a expressão do transcrito no genótipo suscetível, sob déficit hídrico; (iii) Razão BAT 477 controle / IAC-Carioca 80 SH controle: fornece o nível basal de expressão gênica do transcrito no genótipo tolerante comparado ao suscetível, ambos sob suprimento hídrico adequado; (iv) Razão BAT 477 seca / IAC-Carioca 80SH seca: fornece a expressão gênica do transcrito no genótipo tolerante comparado ao suscetível, ambos sob déficit hídrico.

Tabela 9 - Sequências dos iniciadores, utilizados para amplificar os genes de referência e os genes-alvo, através de *RT-qPCR*

Transcrito	Anotação funcional	Sequência 5' – 3' (*Forward/Reverse*)	*Amplicon* (pb)
Act11	*Actin 11*	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	190
β-Tub8	*β-Tubulin 8*	AATGTGAAGTCCAGCGTGTG CTTCCCCAGTGTACCAATGC	163
DREB2C	*DREB2C*	CACCATGCACATGTTAGCGAAAG TTCATGGGAAGAAGGAGGGG	158
B7R	*Ribosomal protein S7e*	CCCGAAGGAGAGAAACAACA GCCTCTGCGACAGGATACTC	105
R8	*Aconitate hydratase*	ATACATACAACGCAATCACCCA GTAAGCATCCTTCACTCCGT	166
R15	*Serine protease family S1C HtrA-related*	GTTCCTATTCCTGGGGATGC AATCATGCCAATGCAACAGA	150
B1C	*HSP 70 protein*	TGATGAGTCCTGAGTAAGGTG CATGACCAAGAAACGCCTC	153
B3C	*Glycosyl hydrolase family 14*	TGGGAATTTCCTGGTATTGG GCCTGCGTCATCTGGTAGTT	117
B6C	*Serine-threonine protein kinase*	TGGAACGAGTGTGGTGAGTG TCTCCTCAACGTGGCTTTG	114
C1C	*S-adenosylmethionine synthase*	GGCTCGTCTCACTGAGGTTC TGGCACCCTTGTCATTGTAA	101
C6C	*Legume lectin domain*	AAGAACGCTCTTCAGGTCCA AACGCCGAGGTTCATATCAC	120
C5	*E3 ubiquitin ligase*	GATGAGTCCTGAGTAATCAACG TGACGAAGAATCAAGTATAGCC	176
B5F	*Aquaporin nodulin MTN3*	CATTTGGAGTCATTCAGATCGT CTAGTTGGTCTTCCTTCTTCTC	200

5.2.3 Análise *in silico* dos genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana*

Devido ao elevado custo e tempo que seriam empregados para a obtenção de uma análise detalhada (espacial e temporal) para todos os transcritos, e também pelo fato de o feijoeiro comum não ser uma espécie de fácil aplicação da genética reversa para explorar a funcionalidade de genes, além de não ter seu genoma totalmente anotado e nem uma experimentação tão extensa quanto à de *A. thaliana*, optou-se por realizar análises *in silico* da expressão gênica dos transcritos que ainda não tiveram a sua expressão detalhada por *RT-qPCR* e também dos que já tiveram, a título de confirmação dos resultados obtidos. Essas análises foram realizadas usando os genes ortólogos de *A. thaliana*, através da plataforma *Genevestigator*.

Como a *A. thaliana* possui um dos genomas mais anotados e manualmente verificados por curadores, e, na maioria das vezes, está amparado por vastos dados experimentais, então é possível realizar a análise funcional dos TDFs de *P. vulgaris*, isolados por *cDNA-AFLP*, através da comparação com os genes ortólogos de *A. thaliana*. Para isso, a sequência individual de cada TDF, foi alinhada com as sequências de *Arabidopsis*, usando *tBLASTX*, na base de dados *TAIR10*, usando o *e-value*: 1×10^{-5} como valor de corte. Assim, foram obtidos os números AGIs, ou seja, a identificação de cada gene ortólogo de *A. thaliana*. De posse desses dados, acessou-se a plataforma *Genevestigator* para a realização das análises *in silico* desses genes ortólogos.

Com base nas amplas possibilidades de análise oferecidas pelo *Genevestigator*, optou-se por realizar quatro tipos de análise, sendo elas: (i) Análise da anatomia - observação dos padrões de expressão dos genes ortólogos de *A. thaliana*, sob seca, nos diferentes órgãos vegetais, sendo possível verificar se o comportamento observado experimentalmente pode ser confirmado; (ii) Análise da corregulação de genes – verificação da possibilidade de que genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos em estudo sejam corregulados por outros tipos de estresse; (iii) Análise de agrupamento hierárquico – realização de um agrupamento de genes com perfis similares de expressão gênica, através da criação de um *heat map*; (iv) Análise *Signature* - utiliza como entrada os valores de expressão gênica, obtidos por *RT-qPCR*, e, com base nesses valores, apresenta as condições experimentais nas quais ocorreram os resultados mais similares de expressão gênica para os genes ortólogos de *A. thaliana*.

5.3 Resultados e Discussão

A análise da expressão gênica espacial e temporal por *RT-qPCR* proporcionou a obtenção de resultados de indução e/ou repressão para os dez TDFs isolados por *cDNA-AFLP* e também para o transcrito *DREB2C*. Dentre esses, os que apresentaram uma indução mais expressiva no genótipo tolerante foram: (i) *ribosomal protein S7e*; (ii) *aconitate hydratase*; (iii) *HSP70*; (iv) *glycosyl hydrolase*; (v) *serine-threonine protein kinase*; (vi) *S-adenosylmethionine synthetase*; (vii) *E3 ubiquitin ligase* e (viii) *aquaporin nodulin MTN3*. Por sua vez, os transcritos que foram induzidos preferencialmente no genótipo suscetível foram: (i) *DREB2C*; (ii) *serine protease S1C HtrA-related* e (iii) *legume lectin* (Figura 30).

Com base no banco de dados *TAIR10* foram identificados os números AGIs dos genes ortólogos de *A. thaliana* correspondentes aos TDFs de feijoeiro comum, isolados por cDNA-AFLP. Os ortólogos em *A. thaliana* e seus respectivos AGIs, quando disponíveis, podem ser visualizados nas Tabelas 10 e 11.

		Raízes				Caules				Folhas			
Transcritos		BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS
DREB2C	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
Ribosomal protein S7e	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
Aconitate hydratase	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
Serine protease family S1C HtrA	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
HSP70 protein	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												

continua

continua

		Raízes				Caules				Folhas			
Transcritos		BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS
Glycosyl hydrolase family 14	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
Serine-threonine protein kinase	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
S-adenosylmethionine synthetase	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
Legume lectin domain	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												
E3 ubiquitin ligase	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												

continua

conclusão

		Raízes				Caules				Folhas			
Transcritos		BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS	BS/BC	CS/CC	BC/CC	BS/CS
Aquaporin nodulin MTN3	24h												
	48h												
	72h												
	96h												
	120h												

Figura 30 - Padrões de expressão gênica, por *RT-qPCR*, do transcrito *DREB2C* e de dez TDFs isolados através da técnica de *cDNA-AFLP*, obtidos a partir de três órgãos vegetais (raízes, caules e folhas), em cinco coletas com níveis crescentes de déficit hídrico (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h após a indução do estresse). Células em vermelho representam indução e células em verde claro representam repressão. BS/BC: BAT 477 sob seca / BAT 477 controle; CS/CC: IAC-Carioca 80SH sob seca / IAC-Carioca 80SH controle; BC/CC: BAT 477 controle / IAC-Carioca 80SH controle; BS/CS: BAT 477 sob seca / IAC-Carioca 80SH sob seca

Tabela 10 - Genes de *A. thaliana*, ortólogos aos TDFs de feijão comum isolados por cDNA-AFLP, os quais apresentaram-se induzidos no genótipo tolerante (BAT 477)

TDF	Ortólogo em *Arabidopsis* (número AGI)	Anotação
B1R	AT1G44575	*Chlorophyll A-B binding protein*
B4R	ATCG00490	*Ribulose biphosphate carboxylase large chain*
B6R	AT1G07890	*Peroxidase*
B7R	AT1G48830	*Ribosomal protein S7e*
B8R	AT4G28390	*Mitochondrial carrier protein*
B11R	AT3G44110	*DNAJ domain – HSP40 protein*
R8	AT4G35830	*Aconitase family (aconitate hydratase)*
B1C	AT1G16030	*HSP70 protein*
B3C	AT4G15210	*Glycosyl hydrolase family 14*
B5C	AT1G51680	*AMP-binding enzyme (4-coumarate-CoA ligase)*
B6C	Sem similaridade	*Serine-threonine protein kinase*
B7C	AT1G79470	*IMP dehydrogenase/GMP reductase domain*
C1	AT4G17770	*Trehalose-phosphatase*
C5	AT1G18660	*E3 ubiquitin ligase*
C6	AT2G36460	*Fructose biphosphate aldolase class-I*
B3F	AT1G55325	*Mediator complex subunit 13 C-terminal*
B4F	AT2G39990	*Translation initiation factor eIF-3 subunit 5*
B5F	Sem similaridade	*Aquaporin nodulin MTN3*
B6F	AT3G63490	*Ribosomal protein L1p / L10e family*
B7F	AT1G69690	*TCP family transcription factor*
F2	AT5G51610	*Ribosomal protein L11*

Tabela 11 - Genes de *A. thaliana*, ortólogos aos TDFs de feijão comum isolados por cDNA-AFLP, os quais apresentaram-se induzidos no genótipo suscetível (IAC-Carioca 80SH)

TDF	Ortólogo em *Arabidopsis* (número AGI)	Anotação
DREB2C	AT2G40340	*Transcription factor DREB2C*
	AT2G40350	
C1R	AT3G01500	*Carbonic Anhydrase*
C2R	Sem similaridade	"novo"
C4R	Sem similaridade	"novo"
C5R	AT2G44040	*Dihydrodipicolinate reductase*
	AT3G59890	
C6R	ATCG00490	*Ribulose biphosphate carboxylase large chain*
R1	AT1G02500	*S-adenosylmethionine synthetase*
R2	AT2G21390	*Coatomer protein complex*
R3	AT2G23530	*Zinc-finger domain of monoamine-oxidase A repressor R1*
R4	AT5G17920	*Cobalamin-independent methionine synthase*
	AT3G03780	
R5	AT4G28390	*Mitochondrial carrier protein*
R10	AT5G58060	*Synaptobrevin*
R11	AT2G38740	*Haloacid dehalogenase-like hydrolase*
R12	AT5G14670	*ADP-ribosylation factor family*
R14	AT5G07900	*Mitochondrial transcription termination factor, mTERF*
R15	AT3G03380	*Serine protease family S1C HtrA-related*
R18	AT5G23630	*Haloacid dehalogenase-like hydrolase*
C1C	AT4G01850	*S-adenosylmethionine synthetase*
C5C	Sem similaridade	"novo"
C6C	AT5G65600	*Legume lectin domain*
C7C	Sem similaridade	"novo"
C8C	Sem similaridade	"novo"
C2	AT5G62990	*Plant organelle RNA recognition domain*
C7	AT3G28900	*Ribosomal protein L34e*
C4F	AT1G76110	*SWI/SNF-related chromatin binding*

5.3.1 Análise da anatomia

Em *A. thaliana*, os transcritos mais expressos nas raízes, sob seca, foram: *peroxidase* (AT1G07890), *4-coumarate-CoA ligase* (AT1G51680), *trehalose-phosphatase* (AT4G17770), *mediator complex subunit 13* (AT1G55325), *S-adenosylmethionine synthetase* (AT1G02500 e AT4G01850), *coatomer protein complex* (AT2G21390), *cobalamin-independent methionine synthase* (AT3G03780), *serine protease family S1C HtrA-related* (AT3G03380) e *ribosomal protein L34e* (AT3G28900). Nos caules, foram mais expressos: *chlorophyll A-B binding protein* (AT1G44575), *ribulose biphosphate carboxylase* (ATCG00490), *trehalose-phosphatase* (AT4G17770), *mediator complex subunit 13* (AT1G55325), *ribosomal protein L1p/L10e* (AT3G63490), *TCP transcription factor* (AT1G69690), *carbonic anhydrase* (AT3G01500) e *haloacid dehalogenase-like hydrolase* (AT2G38740). E, nas folhas foram mais expressos os mesmos transcritos que nos caules, com exceção de *TCP transcription factor* (AT1G69690) e *carbonic anhydrase* (AT3G01500) (Figura 31).

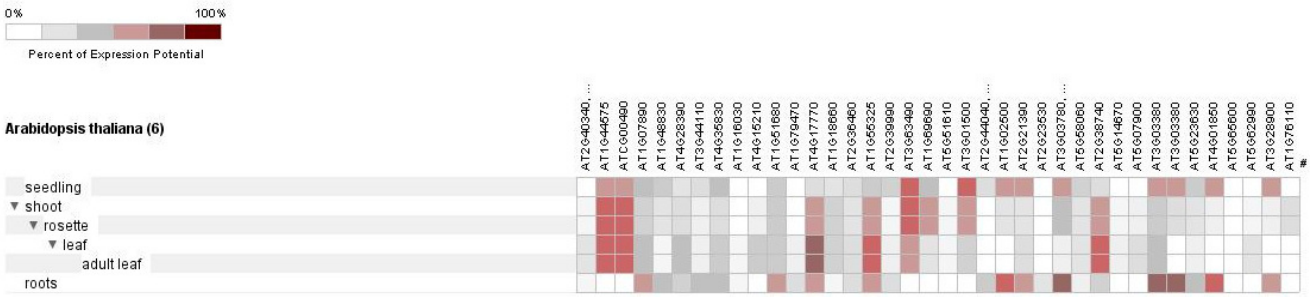

Figura 31 - Padrões de expressão, dos genes ortólogos de *Arabidopsis*, sob seca, nos diferentes órgãos vegetais

Dentre esses transcritos, já haviam sido estudados detalhadamente, por *RT-qPCR*, os transcritos: *S-adenosylmethionine synthetase* e *serine protease family S1C HtrA-related*, sendo que o primeiro apresentou maior indução nas raízes do genótipo tolerante de feijoeiro quando comparado ao suscetível, sob seca; já o segundo apresentou maior indução nas raízes do genótipo suscetível submetido a déficit hídrico. Dessa forma, fica confirmada a importância desses transcritos nos mecanismos de resposta ao déficit hídrico, em ambos os genótipos.

É importante ressaltar que no caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como:

fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos, que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas e, portanto, são mais específicos de cada grupo vegetal (HERBERT, 1989). Dessa forma, é necessário o conhecimento dos processos metabólicos em que cada proteína em estudo está envolvida, a fim de se compreender melhor a necessidade de sua indução e/ou repressão sob déficit hídrico.

A indução de peroxidases, sob seca, ocorre devido ao aumento da atividade antioxidante, principalmente nas raízes, que são o primeiro tecido vegetal a entrar em contato com o déficit hídrico. Essas enzimas têm participação no metabolismo de glutationa (Figura 32) e catalisam a redução do peróxido de hidrogênio, além de oxidarem vários substratos. Essa função bioquímica lhes confere função em diferentes e importantes processos biológicos, tais como mecanismos de defesa, resposta imune, resposta a patógenos e a estresses abióticos (VICUNA; MALONE; DIX, 2011).

Já a enzima *4-coumarate-CoA ligase*, induzida nas raízes de *A. thaliana,* sob seca, é necessária para a manutenção de um contínuo fluxo metabólico para a biossíntese de fenilpropanóides (Figura 33), tais como a lignina e os flavonóides, que são essenciais para a sobrevivência das plantas (HU et al., 1998).

A enzima *trehalose-phosphatase,* que está envolvida no metabolismo de amido e sacarose (Figura 34), apresentou um aumento de sua expressão em raízes, caules e folhas de *A. thaliana*, sob seca. A trehalose é um açúcar, que está presente em uma ampla variedade de organismos, incluindo: bactérias, leveduras, fungos, insetos, invertebrados, plantas inferiores e plantas superiores, nos quais pode servir como fonte de energia e carbono. Em leveduras e plantas, também pode atuar como molécula sinalizadora para direcionar ou controlar certas rotas metabólicas ou até mesmo afetar o crescimento. Além disso, age na osmorregulação e na estabilização de complexos de proteínas e membranas a nível celular (CHEN; MURATA, 2002; HINCHA; HAGEMAN, 2004), protegendo-nas da inativação ou desnaturação, causada por uma grande variedade de condições estressantes, incluindo: dessecação, desidratação, calor, frio e oxidação (ELBEIN et al., 2003).

Os *mediator complex*, tiveram um aumento da sua expressão em raízes, caules e folhas de *A. thaliana*, sob seca. Desde a sua descoberta em leveduras, eles têm sido encontrados experimentalmente e *in silico* em quase todos os eucariotos (BOUBE et al., 2002; BOURBON et al, 2004). A presença dos *mediator complex* em plantas tem sido sugerida com

base na homologia de sequências (AUTRAN et al., 2002; BOUBE et al., 2002; CLAY; NELSON, 2005; GONZALEZ et al., 2007), implicando em um novo grupo de proteínas, as quais são requeridas para a coordenação eficiente do transcritoma. Individualmente, as subunidades parecem possuir funções específicas dentro do complexo, incluindo: resposta a estresses abióticos e bióticos, controle do desenvolvimento, florescimento e fertilidade (KIM et al., 2011).

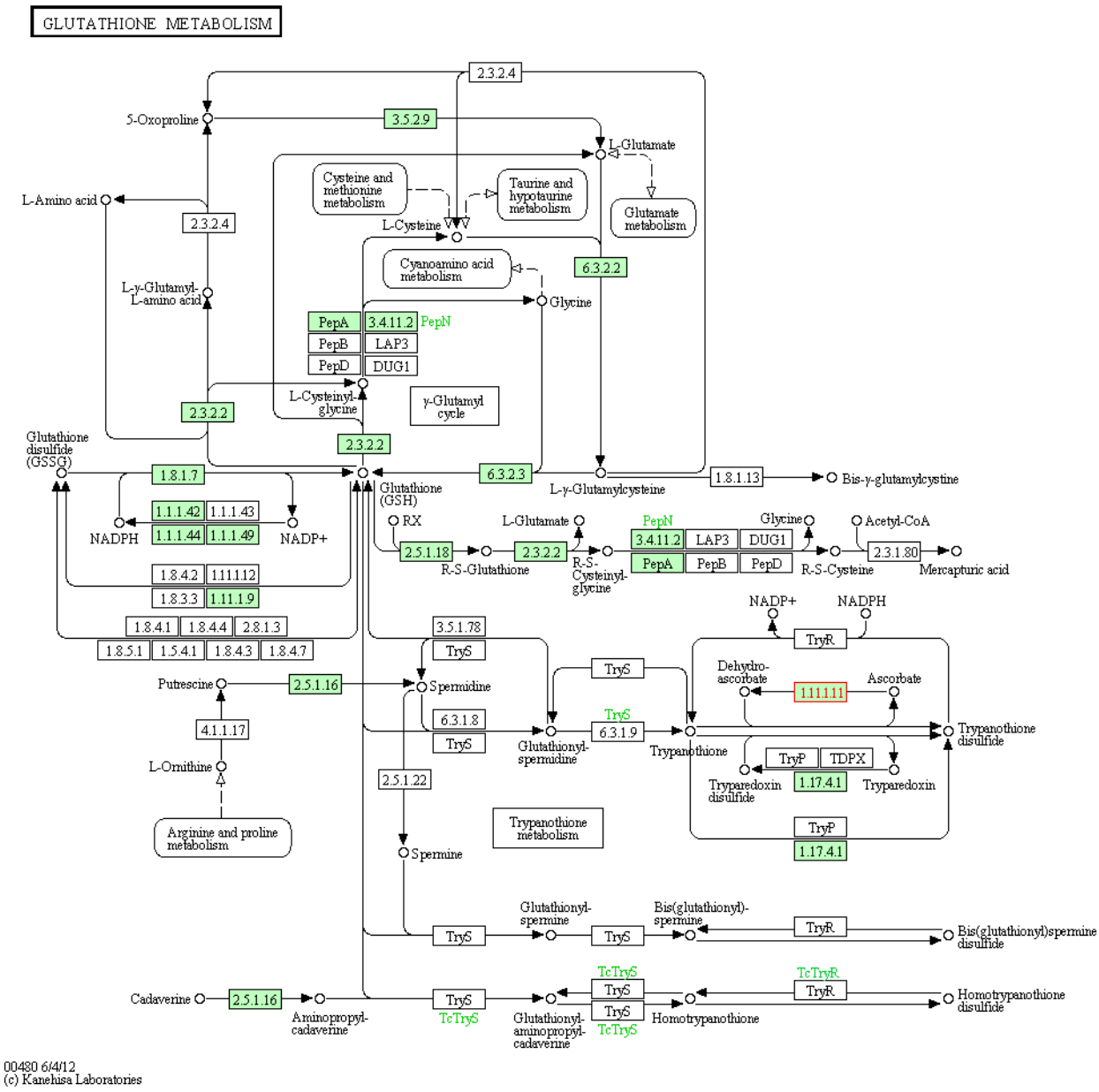

Figura 32 - Rota metabólica de glutationa. A enzima peroxidase aparece com a denominação (1.11.1.11). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

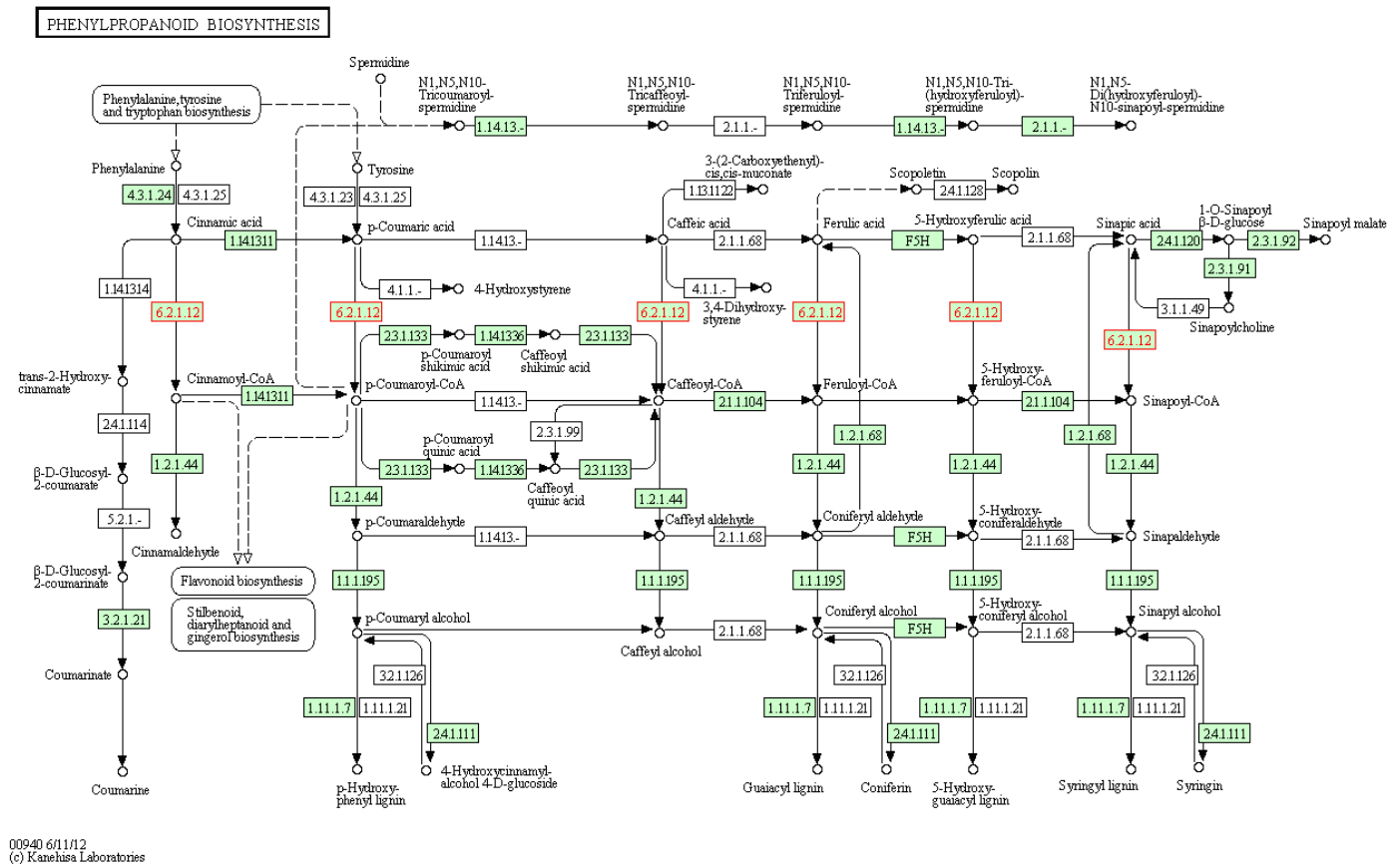

Figura 33 - Rota metabólica de biossíntese de fenilpropanóides. A enzima *4-coumarate-CoA ligase* aparece com a denominação (6.2.1.12). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

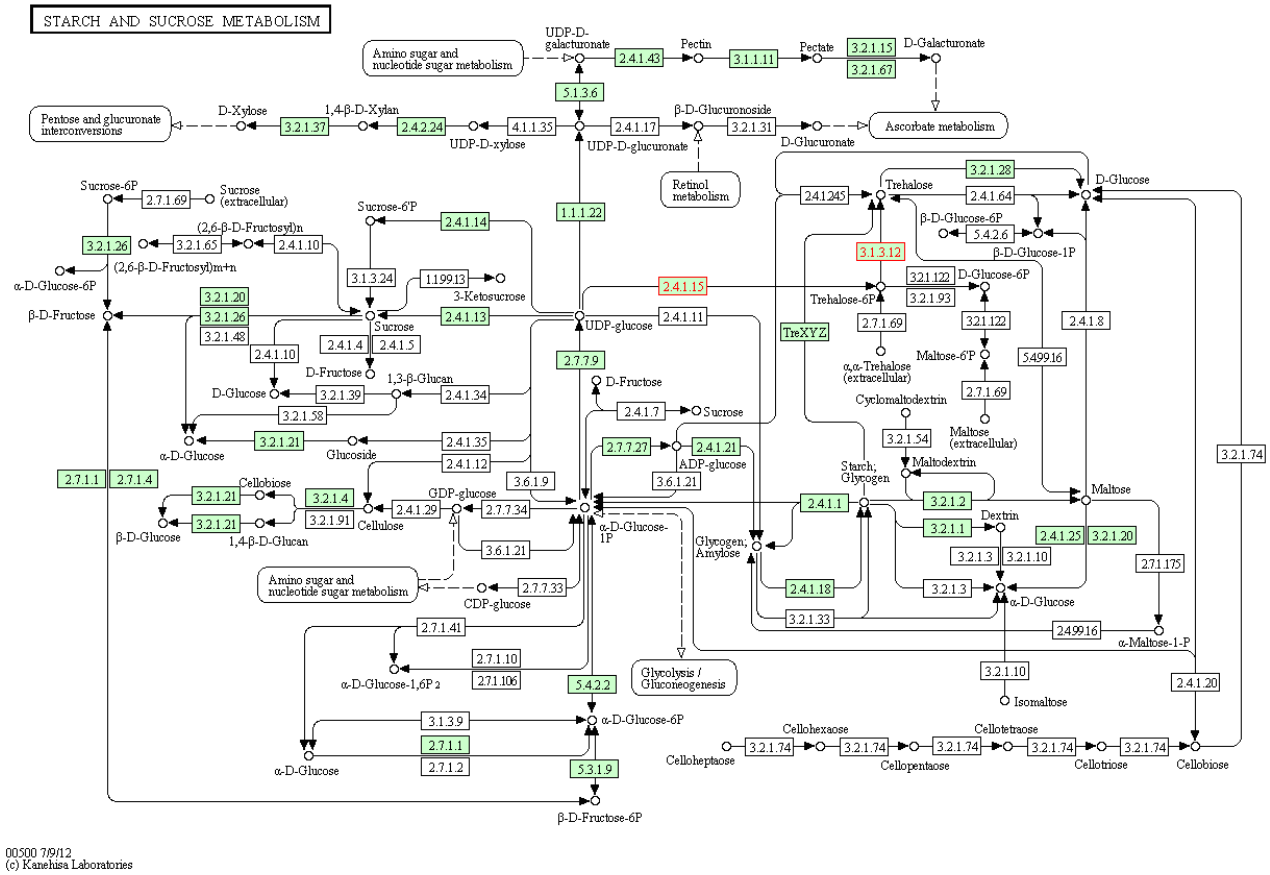

Figura 34 - Rota metabólica de amido e sacarose. A enzima *trehalose-phosphatase* aparece com as denominações (2.4.1.15 e 3.1.3.12). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

As enzimas *cobalamin-independent methionine synthase* (*MetE*) e *S-adenosylmethionine synthetase* (*AdoMet*), ambas induzidas nas raízes de *A. thaliana*, sob seca, estão envolvidas no metabolismo de cisteína e metionina (Figura 35). A primeira catalisa a transferência de um grupo metil a partir do metiltetrahidrofolato para L-homocisteína, sem usar um carregador de metil intermediário (PEJCHAL; LUDWIG, 2005), enquanto que a segunda catalisa a formação de S-adenosilmetionina a partir de metionina e ATP. *AdoMet* é um importante grupo doador de metil para transmetilação e também doador de propilamina na biossíntese de poliaminas (MARKHAM; PAJARES, 2009).

Coatomer protein complex é um complexo de proteínas que reveste as membranas das vesículas de transporte (SIMON et al., 2000). Há indução desse complexo em raízes de *A. thaliana*, sob seca. Cabe ressaltar que a formação de vesículas revestidas é um passo fundamental nas vias de transporte intracelular. E, com a imposição de déficit hídrico, há um aumento da produção de proteínas mal-dobradas e de substâncias tóxicas que devem ser

encapsuladas por esse tipo de vesícula e encaminhadas para destruição nos peroxissomos ou lisossomos, daí a importância do aumento de produção dessas proteínas.

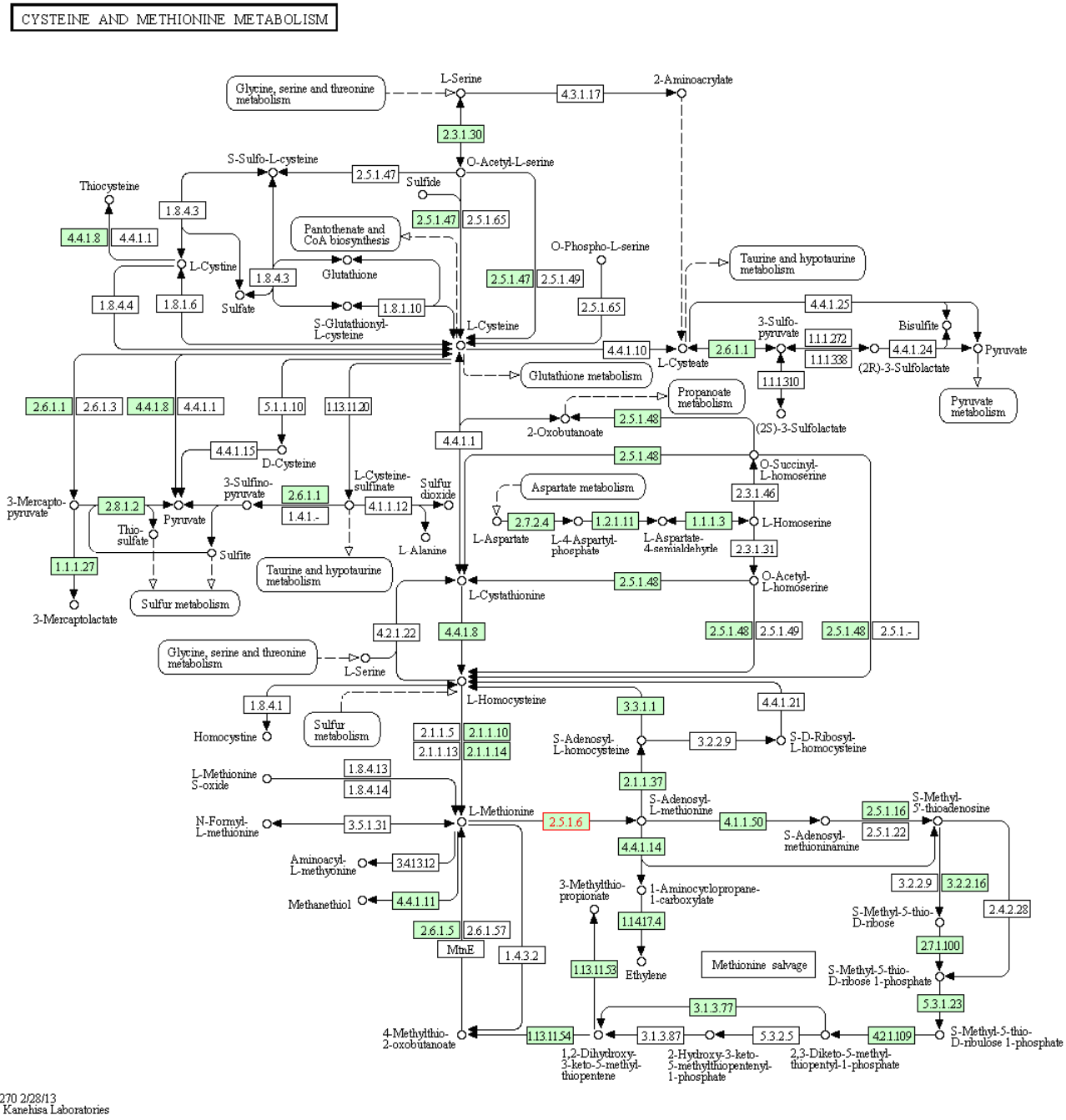

Figura 35 - Rota metabólica da cisteína e da metionina. Participação das enzimas *cobalamin-independent methionine synthase* (2.1.1.14) e *S-adenosylmethionine synthetase* (2.5.1.6). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

O grupo de proteínas *serine protease family S1C HtrA-related* é induzido por choque térmico e outros estresses abióticos (KIM; KIM, 2005) e teve a sua expressão aumentada em raízes de *A. thaliana*, sob déficit hídrico, provavelmente devido à maior quantidade de

proteínas não-funcionais produzidas nessa condição estressante. Como se sabe, esse tipo de protease atua no controle de qualidade das proteínas produzidas na célula, encaminhando para destruição aquelas que não se encontram em um estado funcional, ou, quando possível, auxiliando no seu redobramento para que retornem à forma tridimensional funcional.

As proteínas *ribosomal protein L34e* e *ribosomal protein L1p/L10e* não apresentam função direta na tolerância à seca, contudo, houve um aumento considerável na sua expressão, respectivamente nas raízes, e em caules e folhas de *A. thaliana*, sob seca. Como elas atuam diretamente na síntese de proteínas, esse aumento de expressão observado, pode estar relacionado com a necessidade de sintetizar uma quantidade maior de proteínas, sob a condição de estresse, inclusive daquelas que propiciam uma proteção osmótica eficiente nas células, prevenindo sua total desidratação, o que acarretaria na morte da planta.

Tanto a proteína *chlorophyll A-B binding* quanto a *ribulose biphosphate carboxylase (rubisco)*, as quais tiveram um aumento da sua expressão, respectivamente em caules e folhas de *A. thaliana*, sob seca, têm atuação direta no processo de fotossíntese (Figura 36). O complexo coletor de luz (ou antena) é um arranjo de proteínas e moléculas de clorofila, embebidas na membrana tilacóide, as quais transferem a energia da luz a uma molécula de clorofila no centro de reações do fotossistema. Os pigmentos da antena são predominantemente, clorofila-B, xantofila e carotenóides. A clorofila-A é conhecida como o pigmento nuclear, pois, seu espectro de absorção não se sobrepõe, a fim de ampliar a gama de luz que pode ser absorvida na fotossíntese. Os carotenóides têm função antioxidante para prevenir os danos foto-oxidativos das moléculas de clorofila. Cada complexo antena tem entre 250 e 400 moléculas de pigmento e a energia que eles absorvem é transmitida por ressonância para um complexo de clorofila-proteína, conhecido como centro de reação, o qual dá início a uma série de reações químicas que captura a energia na forma de ligações químicas. No fotossistema II, quando cada uma das duas moléculas de clorofila-A absorve energia no centro de reação, um elétron é excitado e transferido a uma molécula aceptora de elétrons, a feofitina, levando a clorofila-A a um estado oxidado, que substitui os elétrons, através de fotólise. Sob condições de alteração de luminosidade, a fosforilação reversível das proteínas coletoras de luz, *chlorophyll A-B binding,* atua como um sistema de balanceamento de energia entre os dois fotossistemas (LIU; SHEN, 2004). A região N-terminal dessas proteínas estende-se para dentro do estroma, onde é envolvida com a adesão das membranas grana e fotorregulada por fosforilação reversível de seus resíduos treonina (ANDERSSON; YANG; PAULSEN, 2000). Ambos esses processos mediam a distribuição de energia entre os fotossistemas I e II. A enzima rubisco, por sua vez, atua na captação do dióxido de carbono do

ar atmosférico e de um açúcar (ribulose 1,5-bifosfato) presente nas células, promovendo a reação que dá origem a duas moléculas do açúcar fosfoglicerato. Portanto, essa enzima é responsável pelo primeiro passo do Ciclo de Calvin e pela fixação do dióxido de carbono.

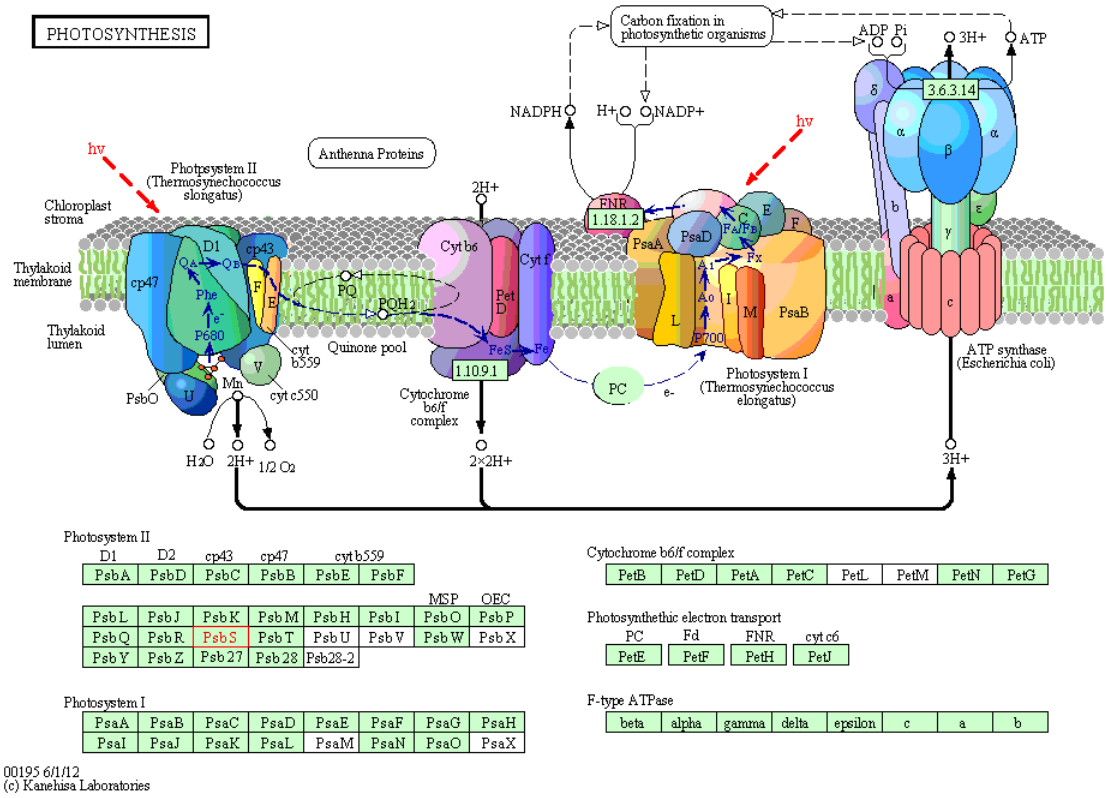

Figura 36 - Processo fotossintético. Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

O *TCP transcription factor* apresentou um aumento da sua expressão, em caules de *A. thaliana*, sob seca. De acordo com Bertolini et al. (2013), a escassez de água modula a expressão de miRNAs, os quais podem possibilitar que a célula tolere o déficit hídrico. Em particular, o *miR319b*, o qual é alvo dos genes TCP, e regula a proliferação das células, sendo significativamente mais expresso em células em proliferação do que em células em expansão (PALATNIK et al., 2003), o que pode explicar o fato de que mesmo sob déficit hídrico as plantas tolerantes continuam crescendo normalmente, enquanto que as suscetíveis têm uma redução drástica no seu crescimento.

A enzima *carbonic anhydrase* atua no metabolismo do nitrogênio (Figura 37) e apresentou um aumento de expressão nos caules de *A. thaliana*, sob seca. Essa enzima catalisa a rápida interconversão de dióxido de carbono e água em bicarbonato e prótons (ou vice-versa), uma reação reversível que ocorre muito lentamente na ausência dessa enzima (BADGER; PRICE, 1994).

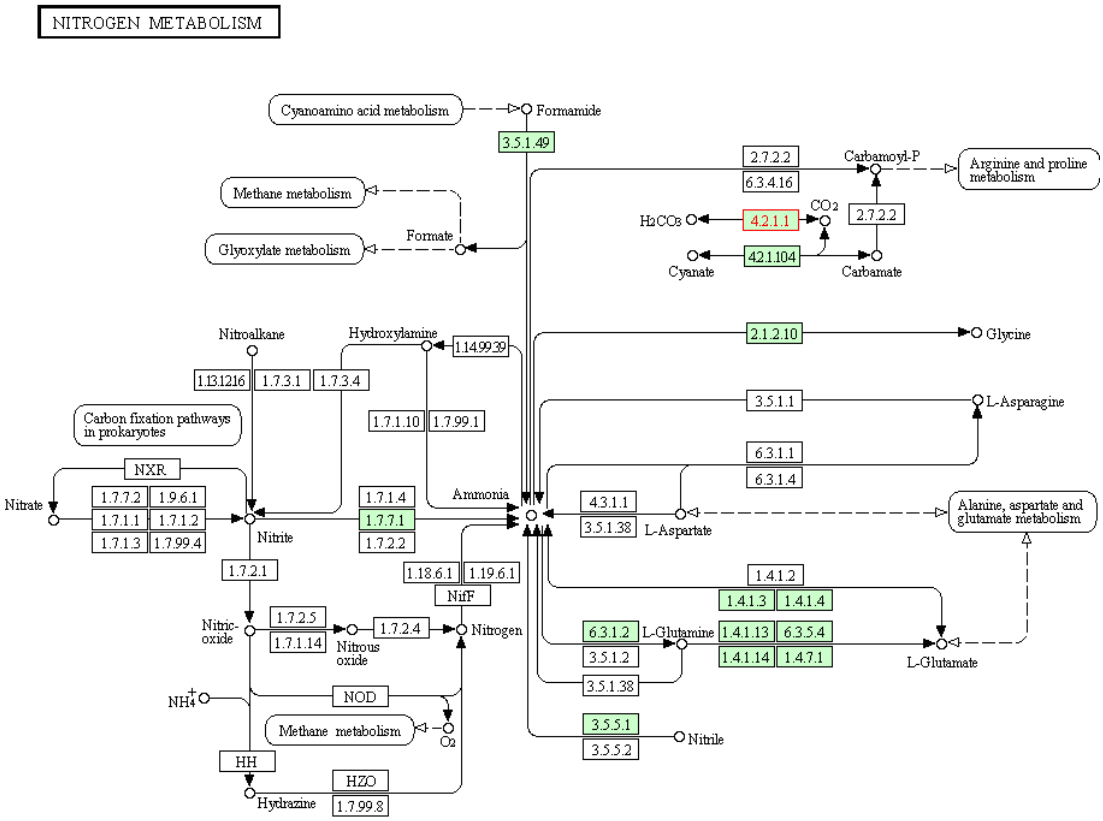

Figura 37 - Metabolismo do nitrogênio. A enzima *carbonic anhydrase* aparece com a denominação (4.2.1.1). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

A enzima *haloacid dehalogenase-like hydrolase* apresentou maior expressão em caules e folhas de *A. thaliana*, sob seca. A grande maioria dessas enzimas são fosfatases (ZHANG et al., 2004; ALLEN; DUNAWAY-MARIANO, 2004), seguidas pelas ATPases (ARAVIND; GALPERIN; KOONIN, 1998; COLLET; VAN SCHAFTINGEN; STROOBANT, 1998) e fosfomutases, também conhecidas como fosfotransferases (COLLET et al., 1998). As proteínas cinases catalisam a reação de adição de um grupamento fosfato, com a quebra do ATP, para produzir a energia necessária para a reação, enquanto que as proteínas fosfatases, fazem exatamente a reação inversa, removendo um grupamento fosfato. Como resultado da ação combinada entre essas proteínas têm-se os ciclos de fosforilação, que são formas de regulação extremamente importantes na célula eucariótica. Esses ciclos permitem que as proteínas fosforiladas passem rapidamente de um estado para outro, em resposta a um estímulo externo. É importante salientar que a adição/remoção do fosfato pode alterar os possíveis ligantes da superfície da proteína, sendo um mecanismo importante de sinalização celular, e fundamental no processo de montagem e desmontagem de complexos protéicos. As ATPases formam uma família de enzimas que catalisam a hidrólise do ATP

(adenosina trifosfato) para originar ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico, com liberação de energia. As fosfotransferases são um grupo de enzimas que catalisam uma transferência intramolecular de um grupo fosfato. Diante do detalhamento da função dessas enzimas, fica evidente que elas apresentam grande importância na resposta a estresses abióticos, como a seca, por exemplo.

5.3.2 Análise da corregulação de genes

A análise da corregulação de genes possibilita encontrar grupos de genes que são corregulados sob determinadas condições. Então, ao visualizar os módulos de genes corregulados, pode-se visualizar um conjunto de condições, sob as quais eles são regulados da mesma maneira. Para esse tipo de análise, são produzidas matrizes em preto e branco, que permitem a visualização das condições testadas e dos genes, sendo que as células em preto representam os valores que preenchem os requisitos listados (indução ou repressão). Diante disso, foram utilizados os ortólogos de *A. thaliana* para criar duas matrizes binárias de expressão relativa, uma com os genes induzidos e a outra com os genes reprimidos, sob a condição de déficit hídrico.

Os ortólogos de *A. thaliana* que apresentaram indução em um ou mais experimentos, sob seca, foram: *DREB2C* (AT2G40340), *ribulose biphosphate carboxylase* (ATCG00490), *peroxidase* (AT1G07890), *ribosomal protein S7e* (AT1G48830), *mitochondrial carrier protein* (AT4G28390), *HSP40 protein* (AT3G44110), *aconitate hydratase* (AT4G35830), *HSP70* (AT1G16030), *glycosyl hydrolase* (AT4G15210), *4-coumarate-CoA ligase* (AT1G51680), *IMP dehydrogenase/GMP reductase domain* (AT1G79470), *trehalose-phosphatase* (AT4G17770), *E3 ubiquitin ligase* (AT1G18660), *fructose biphosphate aldolase* (AT2G36460), *mediator complex subunit 13* (AT1G55325), *carbonic anhydrase* (AT3G01500), *dihydrodipicolinate reductase* (AT2G44040), *S-adenosylmethionine synthetase* (AT1G02500 e AT4G01850), *coatomer protein complex* (AT2G21390), *synaptobrevin* (AT5G58060), *haloacid dehalogenase-like hydrolase* (AT2G38740 e AT5G23630), *ADP-ribosylation factor* (AT5G14670), *serine protease family S1C HtrA-related* (AT3G03380), *legume lectin* (AT5G65600), *plant organelle RNA recognition* (AT5G62990) e *ribosomal protein L34e* (AT3G28900) (Figura 38).

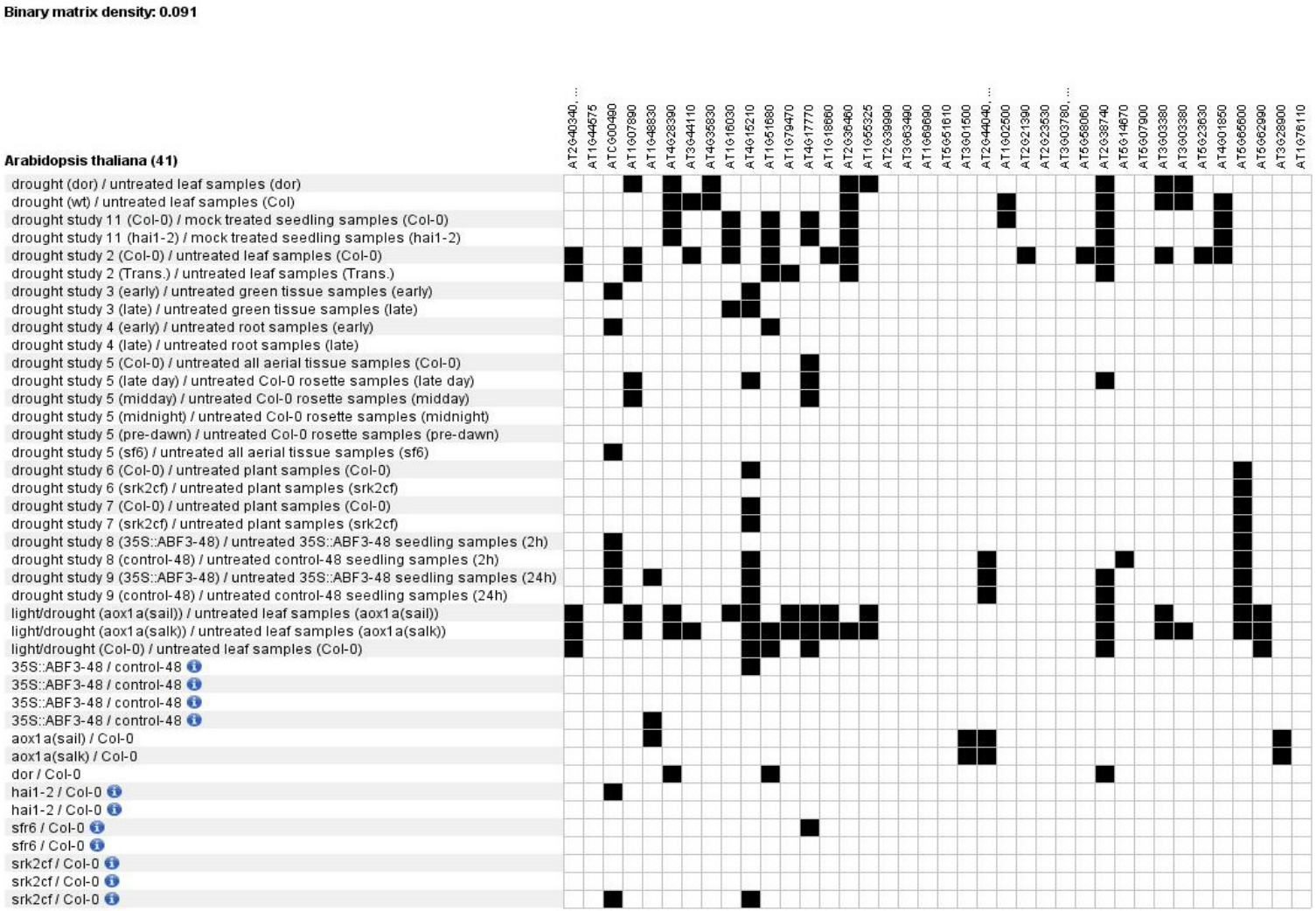

Figura 38 - Genes corregulados sob seca. As células em preto representam as condições nas quais os genes ortólogos são induzidos em *A. thaliana*

O transcrito *DREB2C* é um fator de transcrição induzido principalmente por calor em *A. thaliana* (CHEN et al., 2010). Porém, cabe ressaltar que tanto o calor, quanto a seca e a salinidade ocasionam estresse osmótico nas células vegetais, o que pode acarretar em respostas adaptativas similares, tais como a indução desse fator de transcrição, o qual ativa uma série de genes responsivos a estresses abióticos.

As *mitochondrial carrier proteins* aparecem super representadas nos genes responsivos a estresses, sugerindo que o estresse induz necessidades alteradas para o transporte de metabólitos através da membrana mitocondrial interna (VAN AKEN et al., 2009).

Tanto as chaperonas *HSP70*, quanto as *HSP40* atuam em uma série de maquinarias celulares, que auxiliam no processo de dobramento de uma ampla gama de proteínas, na maior parte dos compartimentos celulares (WANG et al., 2004). Além disso, os membros da família *HSP70* previnem a agregação e auxiliam no dobramento de proteínas sob condições de estresse, estando também envolvidos nos processos de importação, translocação e facilitação da degradação proteolítica de proteínas instáveis através da marcação dessas proteínas para serem transportadas aos lisossomos ou proteossomos (Figura 39) (WANG et al., 2004; XU; HUANG, 2010).

A enzima *aconitate hydratase* isomeriza citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico (Figura 40), então, a sua indução sugere uma contribuição nos mecanismos de tolerância associados ao metabolismo de carboidratos (Figura 40).

A enzima *glycosyl hydrolase* está envolvida em diversos processos biológicos, incluindo: metabolismo de amido, defesa e remodelamento da parede celular (TYLER et al., 2010).

As enzimas *IMP dehydrogenase/GMP reductase* estão envolvidas no metabolismo de purinas (Figura 41). A via biossintética de purinas é central no metabolismo de qualquer organismo. Seus produtos como IMP, AMP e GMP são precursores de DNA, RNA e importantes cofatores como coenzima A, FAD, NAD e NADP. Em plantas, essa via biossintética é especialmente importante, pois seus produtos são precursores de fitormônios como citocininas, de ureídeos, compostos envolvidos na fixação simbiótica/estocagem do nitrogênio em leguminosas e de importantes alcalóides como teobromina e cafeína (FEITOSA et al., 2005).

Proteínas *E3 ubiquitin ligase*, do tipo *RING finger*, já foram descritas como responsivas à seca em várias espécies vegetais, tais como: *Arabidopsis thaliana*, arroz,

Capsicum annuum, milho e *Artemisia desertorum* (QIN et al., 2008; LIU et al., 2008; LEE et al., 2009; HUAI; ZHENG; WANG, 2009; YANG et al., 2008).

A enzima *fructose biphosphate aldolase* (FBA) participa do metabolismo de frutose e manose (Figura 42), catalisando a clivagem de β-frutose-1,6-fosfato (FBP) a D-gliceraldeído-3-fosfato (GBP) e dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (RUTTER, 1964), os quais estão envolvidos tanto na via glicolítica/gliconeogênica quanto no ciclo fosfato pentose em plantas (GROSS et al., 1999).

A enzima *dihydrodipicolinate reductase*, atua na biossíntese de lisina (Figura 43), no grupo doador CH-CH com NAD^+ ou $NADP^+$ como aceptores (SCAPIN et al., 1997). Muitos genes para biossíntese de lisina são reprimidos sob déficit hídrico, enquanto que genes para a sua degradação são induzidos, sugerindo uma redução na quantidade de lisina, como consequência da seca (BETTI et al., 2012).

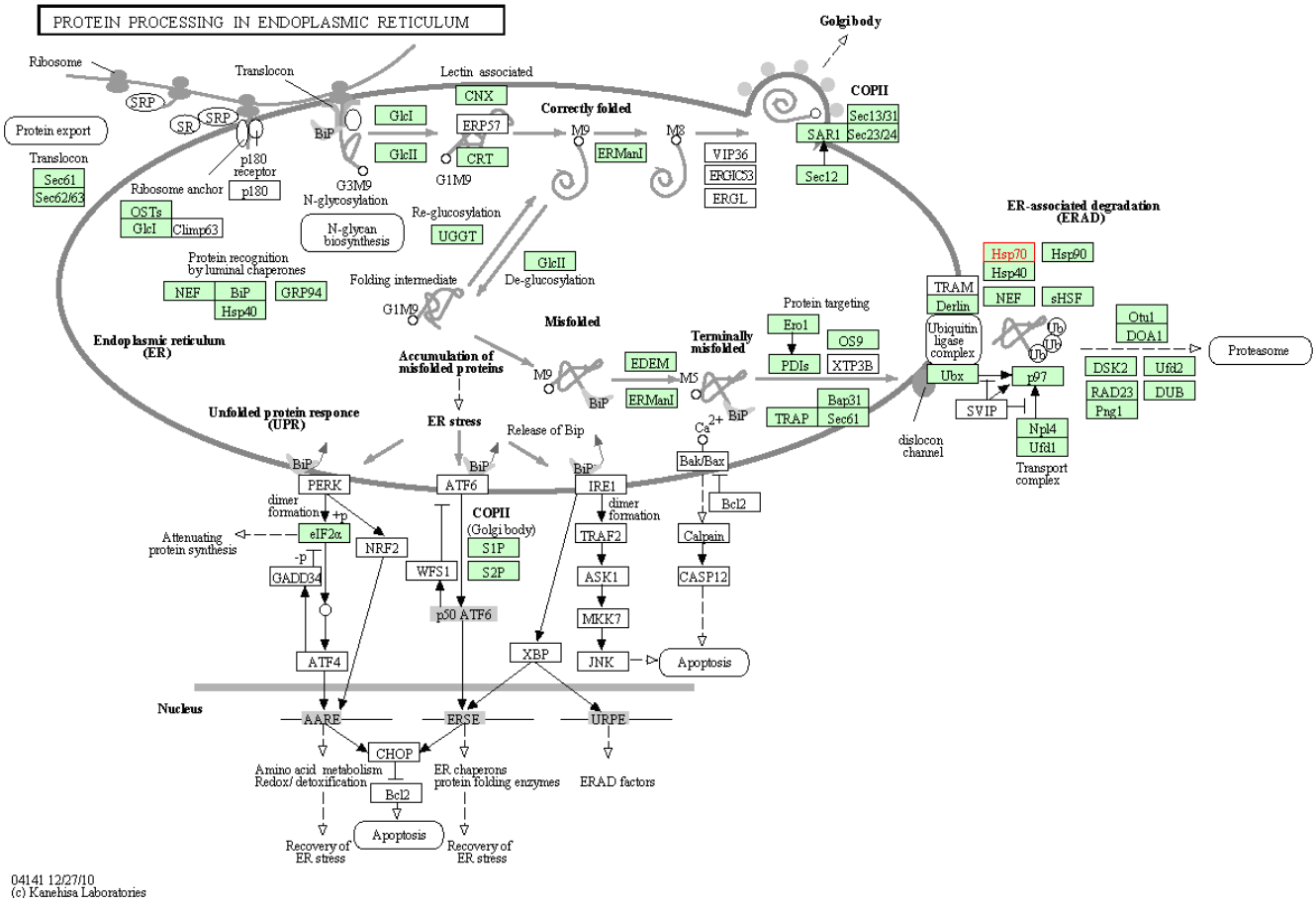

Figura 39 - Processamento de proteínas no retículo endoplasmático. A proteína *HSP70* aparece com a denominação (1.3.1.26). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

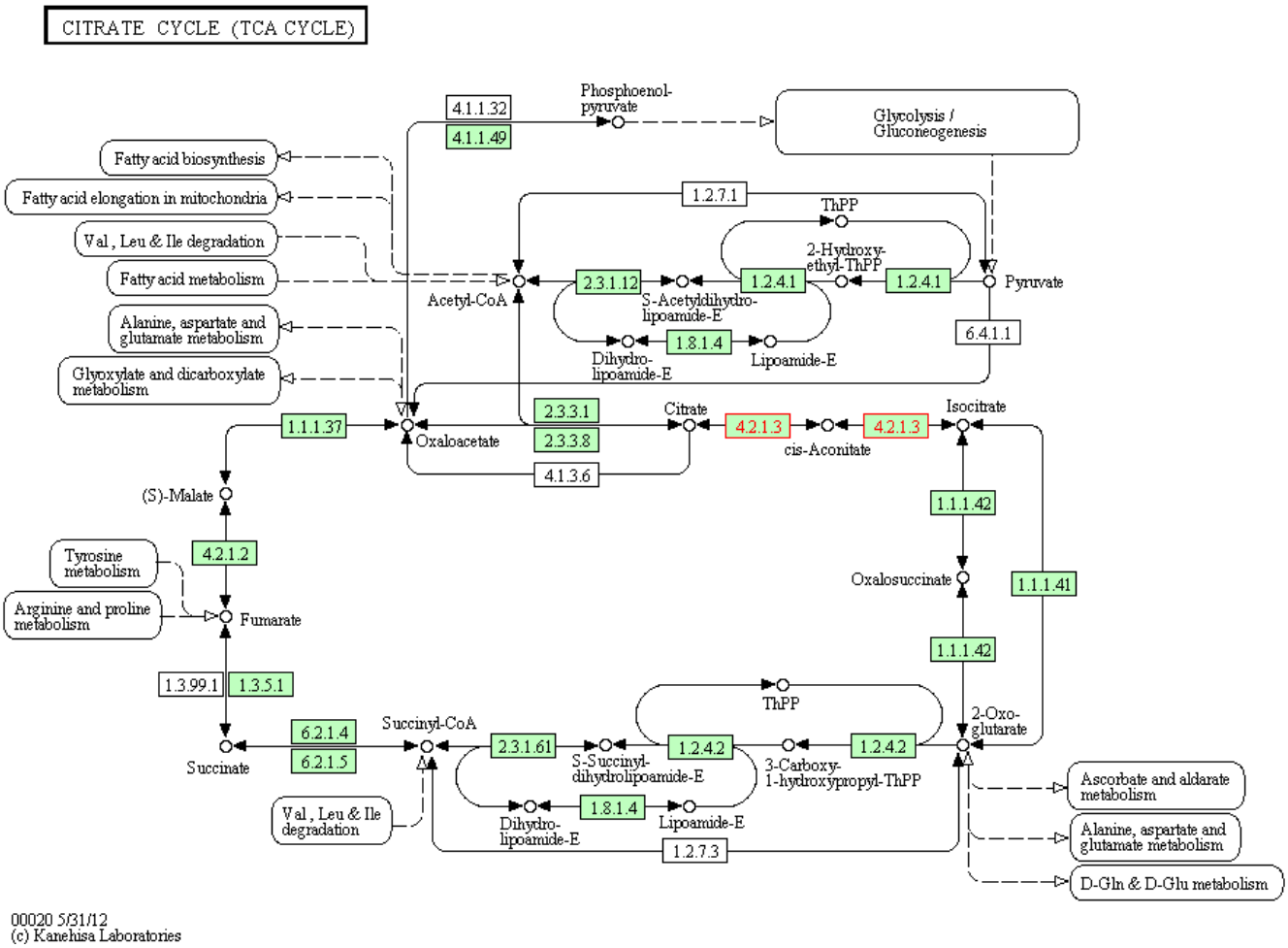

Figura 40 - Ciclo do ácido cítrico. A enzima aconitate hydratase aparece com a denominação (4.2.1.3). Esquema obtido no programa KEGG Pathway

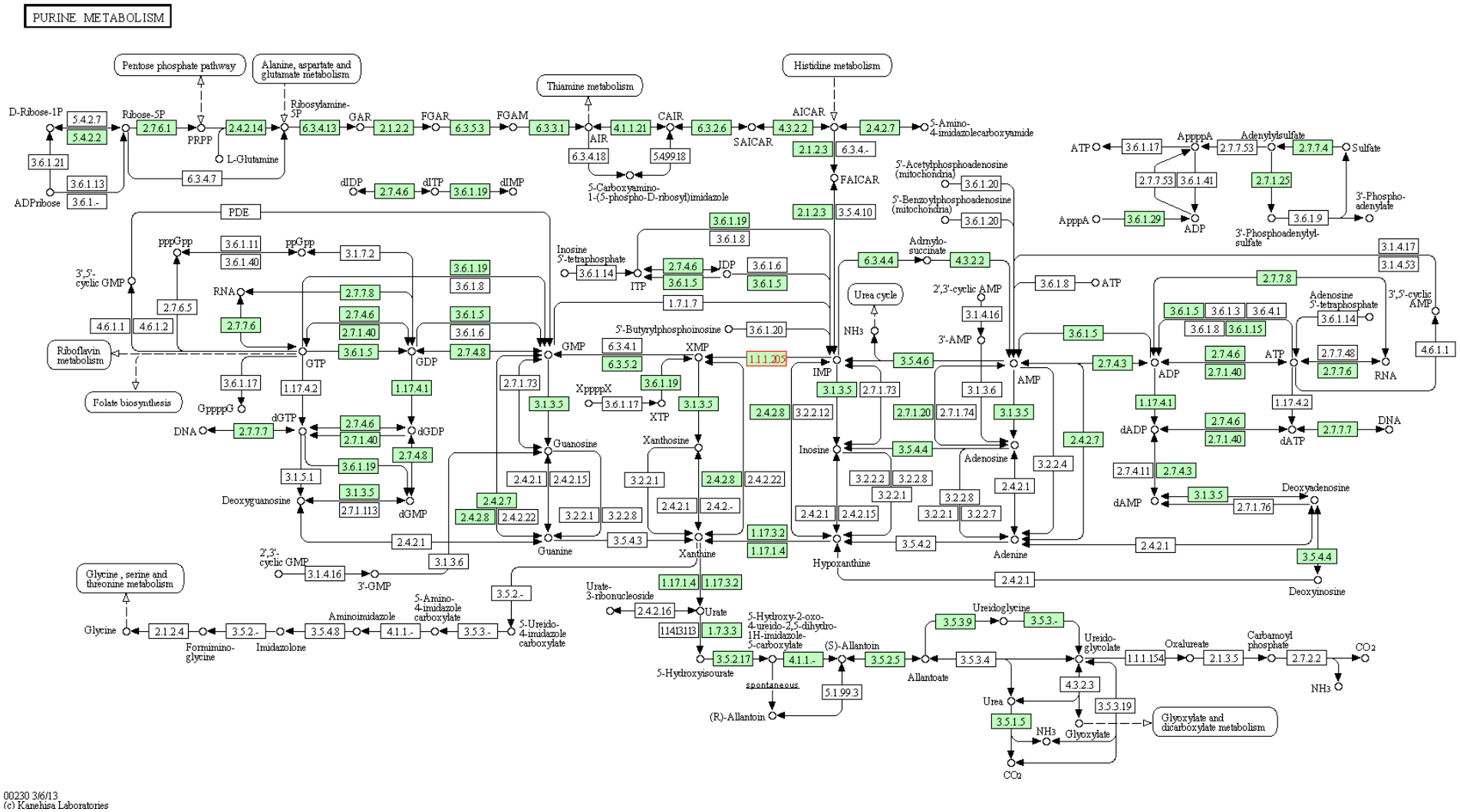

Figura 41 - Metabolismo de purinas. A enzima *IMP dehydrogenase/GMP reductase* aparece com a denominação (1.1.1.205). Esquema obtido no programa KEGG Pathway

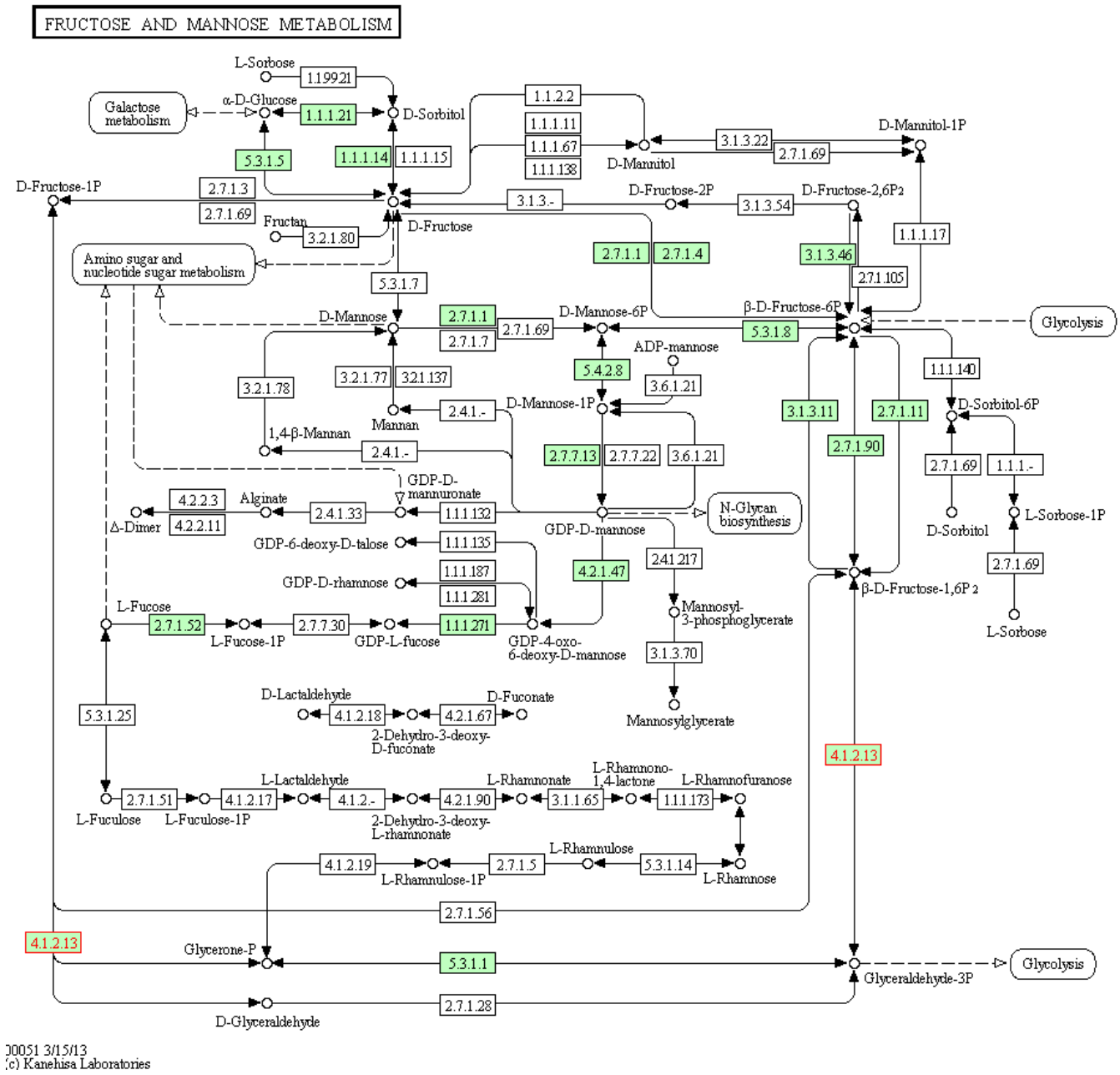

Figura 42 – Metabolismo de frutose e manose. A enzima *fructose biphosphate aldolase* aparece com a denominação (4.1.2.13). Esquema obtido no programa KEGG Pathway

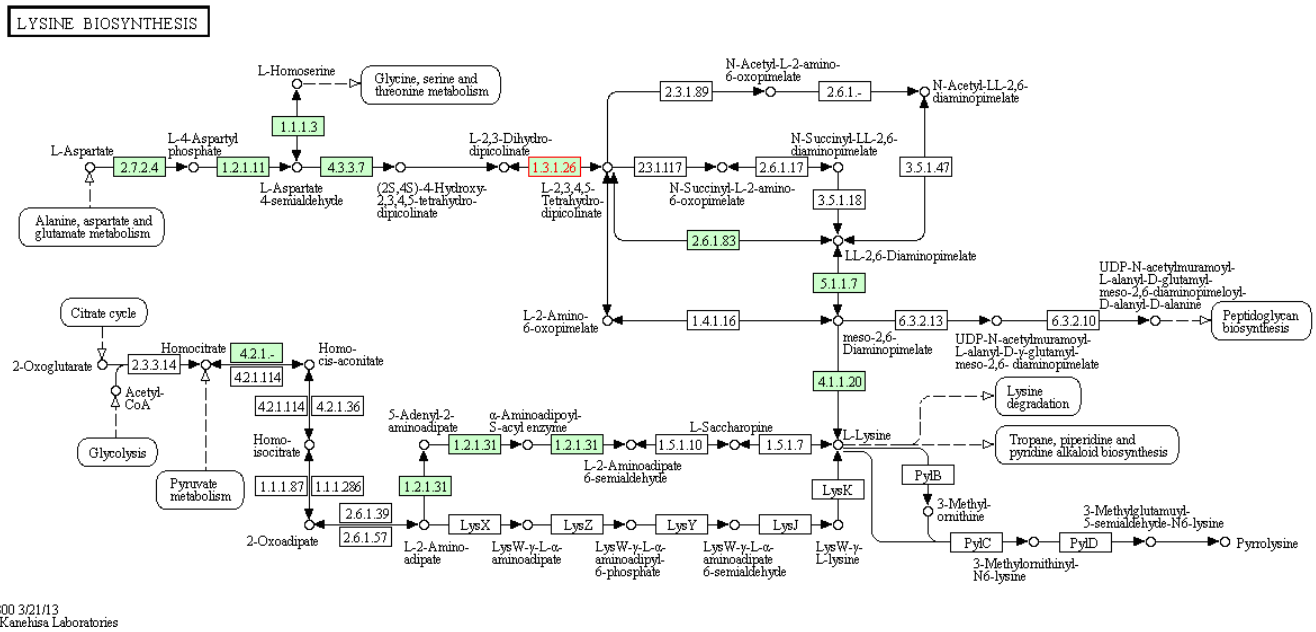

Figura 43 - Rota metabólica de biossíntese de lisina. A enzima *dihydrodipicolinate reductase* aparece com a denominação (1.3.1.26). Esquema obtido no programa *KEGG Pathway*

As proteínas *synaptobrevin* restauram o tráfego vesicular e fornecem tolerância a concentrações letais de peróxido de hidrogênio (LEVINE et al., 2001), portanto, estão relacionadas com a superação do estresse oxidativo. E, os *ADP-ribosylation factor* agem na regulação do recrutamento dos *coatomer protein complex* e elementos da matriz do Complexo de Golgi (MATHESON et al., 2007), agindo também como reguladores do tráfego vesicular e na remodelação da actina, e, portanto, auxiliando na superação do estresse.

Cada membro da superfamília de genes *legume lectin* codifica para proteínas com funções especializadas em uma condição específica de estresse (frio, seca, alta salinidade ou estresse biótico) (JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010).

As proteínas *plant organelle RNA recognition* atuam no metabolismo de RNA nas organelas (KONISHI; SUGIYAMA, 2006) e são requeridas para o *splicing* dos íntrons com os quais se associam.

Os ortólogos de *A. thaliana* que apresentaram repressão em um ou mais experimentos, sob seca, foram: *chlorophyll A-B binding protein* (AT1G44575), *ribulose biphosphate carboxylase* (ATCG00490), *ribosomal protein S7e* (AT1G48830), *mitochondrial carrier protein* (AT4G28390), *glycosyl hydrolase* (AT4G15210), *4-coumarate-CoA ligase* (AT1G51680), *IMP dehydrogenase/GMP reductase domain* (AT1G79470), *trehalose-phosphatase* (AT4G17770), *fructose biphosphate aldolase* (AT2G36460), *mediator complex*

subunit 13 (AT1G55325), *ribosomal protein L1p/L10e* (AT3G63490), *TCP transcription factor* (AT1G69690), *carbonic anhydrase* (AT3G01500), *dihydrodipicolinate reductase* (AT2G44040), *cobalamin-independent methionine synthase* (AT3G03780), *haloacid dehalogenase-like hydrolase* (AT2G38740), *mTERF* (AT5G07900), *serine protease family S1C HtrA-related* (AT3G03380), *legume lectin domain* (AT5G65600), *ribosomal protein L34e* (AT3G28900) e *SWI/SNF-related chromatin binding* (AT1G76110) (Figura 44).

Os fatores de terminação da transcrição (*mTERFs*) contribuem para a regulação da expressão gênica das organelas em diferentes estágios de desenvolvimento e órgãos vegetais, ou ainda em resposta às demandas ambientais, como por exemplo, a seca (ROBLES; MICOL; QUESADA, 2012).

O gene *SWI/SNF-related chromatin binding* desempenha funções vitais na regulação do desenvolvimento e na expressão gênica tecido-específica (WILSKER et al., 2002), atuando inclusive na remodelação da actina sob estresse.

Como se pode observar, a maior parte dos transcritos apresentaram indução e/ou repressão em determinadas condições de imposição de déficit hídrico, comprovando que os genes isolados por *cDNA-AFLP* realmente são regulados por esse estresse abiótico.

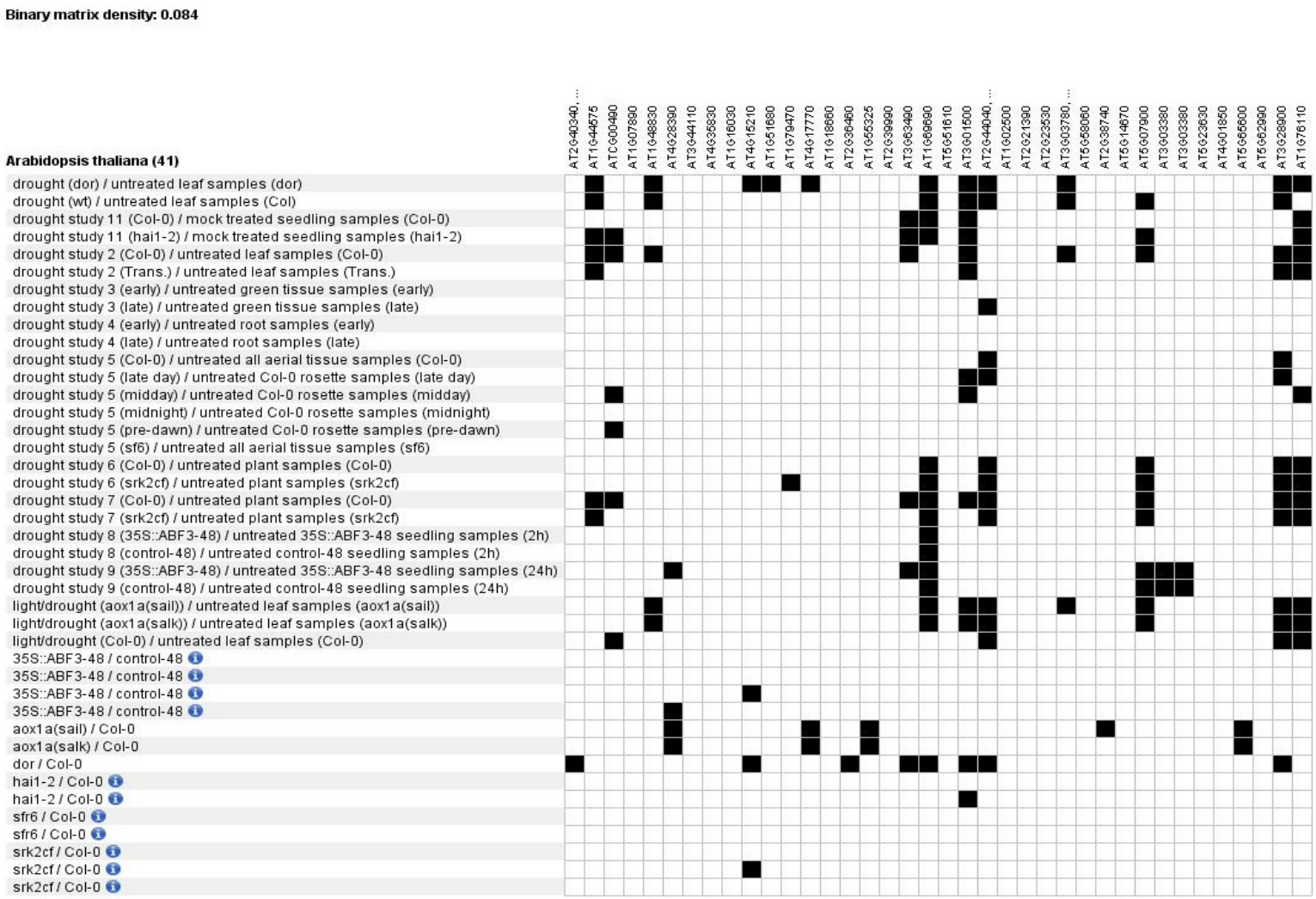

Figura 44 - Genes corregulados sob seca. As células em preto representam as condições nas quais os genes ortólogos são reprimidos em *A. thaliana*

5.3.3 Análise de agrupamento hierárquico dos genes ortólogos de A. thaliana

A análise de agrupamento hierárquico realiza agrupamentos sucessivos de amostras e genes, de acordo com as distâncias medidas, gerando um dendograma, o qual une os genes e as amostras, de modo que é possível deduzir diversos grupos com perfil semelhante de variação.

Considerando o agrupamento hierárquico obtido para os genes ortólogos de *A. thaliana*, é possível afirmar que vários transcritos apresentam um perfil similar de expressão gênica. Os transcritos *glycosyl hydrolase* (AT4G15210), *mitochondrial carrier protein* (AT4G28390), *trehalose-phosphatase* (AT4G17770) e *transcription factor DREB2C* (AT2G40340) apresentaram um padrão de indução bastante evidente em experimentos com *A. thaliana,* sob seca. E, os transcritos *cobalamin-independent methionine synthase* (AT3G03780), *chlorophyll A-B binding protein* (AT1G44575), *SWI/SNF-related chromatin binding* (AT1G76110), *TCP transcription factor* (AT1G69690), *ribosomal protein L34e* (AT3G28900), *dihydrodipicolinate reductase* (AT2G44040) e *carbonic anhydrase* (AT3G01500) tiveram um padrão bem visível de repressão sob seca (Figura 45). É importante destacar que esses resultados corroboram os que foram obtidos através da análise de corregulação de genes.

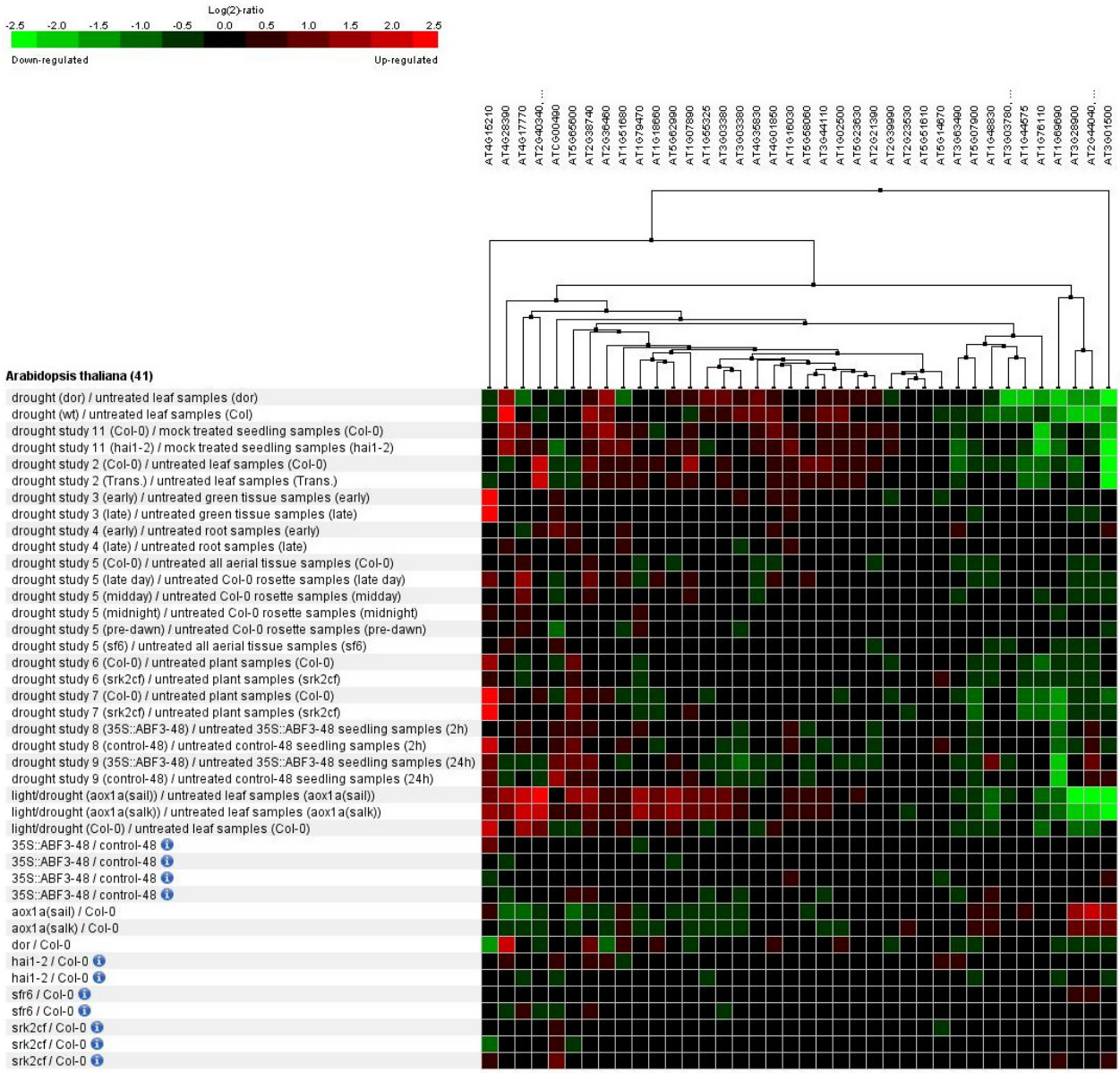

Figura 45 - *Heat map* com agrupamento hierárquico dos genes ortólogos de *A. thaliana*, correspondentes aos TDFs de *P. vulgaris*

5.3.4 Análise Signature

Por meio da ánalise *Signature* foi possível identificar as condições experimentais, nas quais ocorreram resultados de expressão similares aos que foram obtidos através das análises de expressão gênica espacial e temporal, por *RT-qPCR* (detalhada no item 3).

Pode-se afirmar que os transcritos, cuja expressão foi analisada espacial e temporalmente por *RT-qPCR*, apresentaram uma expressão bastante similar a de outros experimentos conduzidos com *A. thaliana* sob estresses abióticos, principalmente com estresse por seca, frio, osmótico e oxidativo. E, os transcritos que tiveram uma maior similaridade de resposta em *A. thaliana* foram *HSP70* (AT1G16030) e *glycosyl hydrolase* (AT4G15210) (Figura 46).

Figura 46 - Análise *Signature*. Identificação de experimentos com *A. thaliana*, nos quais ocorreram resultados de expressão gênica similares aos obtidos com os TDFs de *P. vulgaris*

5.4 Conclusões

Através das análises *in silico*, foram descobertos processos e vias metabólicas que podem estar envolvidos na resposta do feijoeiro comum contra o déficit hídrico. Além disso, foram identificados genes associados com a tolerância à seca, corroborando os dados experimentais obtidos nos capítulos anteriores.

Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho fornecem o entendimento necessário ao desenvolvimento de ferramentas moleculares (marcadores para genes diferencialmente regulados) para serem utilizados em programas de melhoramento do feijoeiro comum, bem como para informação genética básica na anotação funcional do genoma do feijoeiro comum e também para utilização dos genes candidatos em trabalhos de transformação genética para obtenção de plantas mais tolerantes à seca.

Referências

ACOSTA-DÍAZ, E.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; TREJO-LÓPEZ, C.; PADILLA-RAMÍREZ, J.S.; AMADOR-RAMÍREZ, M. D. Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress. **Agricultura Técnica en México**, Mexico, DF, v. 35, n. 4, p. 416-425, 2009.

ALLEN, K.N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 495-503, 2004.

ANDERSSON, B.; YANG, D.H.; PAULSEN, H. The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 466, n. 2-3, p. 385-388, 2000.

ARAVIND, L.; GALPERIN, M.Y.; KOONIN, E.V. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 127-129, 1998.

AUTRAN, D.; JONAK, C.; BELCRAM, K.; BEEMSTER, G.T.; KRONENBERGER, J.; GRANDJEAN, O.; INZÉ, D.; TRAAS, J. Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 21, n. 22, p. 6036-6049, 2002.

BADGER, M.R.; PRICE, G.D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 369-392, 1994.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 15, n. 3, p. 4-7, 2000.

BERGMANN, S.; IHMELS, J.; BARKAI, N. Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 2, n. 1, p. E9, 2004.

BERTOLINI, E.; VERELST, W.; HORNER, D.S.; GIANFRANCESCHI, L.; PICCOLO, V.; INZÉ, D.; PÈ, M.E.; MICA, E. Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. **Molecular Plant**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 423-443, 2013.

BETTI, M.; PÉREZ-DELGADO, C.; GARCÍA-CALDERÓN, M.; DÍAZ, P.; MONZA, J.; MÁRQUEZ, A.J. Cellular stress following water deprivation in the model legume Lotus japonicus. **Cells**, Basel, v. 1, n. 4, p. 1089-110, 2012.

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**, New York, v. 31, n. 5, p. 827-838, 2012.

BOUBE, M.; JOULIA, L.; CRIBBS, D.L.; BOURBON, H.M. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 143-51, 2002.

BOURBON, H.M.; AGUILERA, A.; ANSARI, A.Z.; ASTURIAS, F.J.; BERK, A.J.; BJORKLUND, S.; BLACKWELL, T.K.; BORGGREFE, T.;CAREY, M.; CARLSON, M.; CONAWAY, J.W.; CONAWAY, R.C.; EMMONS, S.W.; FONDELL, J.D.; FREEDMAN, L.P.; FUKASAWA, T.; GUSTAFSSON, C.M.; HAN, M.; HE, X.; HERMAN, P.K.; HINNEBUSCH, A.G.; HOLMBERG, S.; HOLSTEGE, F.C.; JAEHNING, J.A.; KIM, Y-J.; KURAS, L.; LEUTZ, A.; LIS, J.T.; MEISTERERNEST, M.; NAAR, A.M.; NASMYTH, K.; PARVIN, J.D.; PTASHNE, M.; REINBERG, D.; RONNE, H.; SADOWSKI, I.; SAKURAI, H.; SIPICZKI, M.; STERNBERG, P.W.; STILLMAN, D.J.; STRICH, R.; STRUHL, K.; SVEJSTRUP, J.Q.; TUCK, S.; WINSTON, F.; ROEDER, R.G.; KORNBERG, R.D. A unified nomenclature for protein subunits of Mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 553-557, 2004.

BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, 1993.

BRAZMA, A.; PARKINSON, H.; SARKANS, U.; SHOJATALAB, M.; VILO, J.; ABEYGUNAWARDENA, H.; HOLLOWAY, E.; KAPUSHESKY, M.; KEMMEREN, P.; LARA, G.G.; OEZCIMEN, A.; ROCCA-SERRA, P.; SANSONE, S.A. ArrayExpress – a public repository for microarray gene expression data at the EBI. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 1, p. 68-71, 2003.

CHEN, H.; HWANG, J.E.; LIM, C.J.; KIM, D.Y.; LEE, S.Y.; LIM, C.O. *Arabidopsis* DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 401, n. 2, p. 238-244, 2010.

CHEN, T.H.H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 3, p. 250-257, 2002.

CLAY, N.K.; NELSON, T. The recessive epigenetic swellmap mutation affects the expression of two step II splicing factors required for the transcription of the cell proliferation gene STRUWWELPETER and for the timing of cell cycle arrest in the *Arabidopsis* leaf. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, n. 7, p. 1994-2008, 2005.

COLLET, J.F.; STROOBANT, V.; PIRARD, M.; DELPIERRE, G.; VAN SCHAFTINGEN, E. A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal D*X*D*X*(T/V) motif. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 23, p. 14107-14112, 1998.

COLLET, J.F.; VAN SCHAFTINGEN, E.; STROOBANT, V. A new family of phosphotransferases related to P-type ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 284, 1998.

CRAIGON, D.J.; JAMES, N.; OKYERE, J.; JOTHAM, J.; MAY, S. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 1, p. D575-D577, 2004.

EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A.E. Gene expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 1, p. 207-210, 2002.

ELBEIN, A.D.; PAN, Y.T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 17R-27R, 2003.

FEITOSA, L.C.L.; DEBARRY, R.B.; JUNIOR, W.J.A.M.; ALVES, D.F.; MARBACH, P.A.S. História evolutiva da via biossintética de purinas revela antigos segredos da vida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos**... Águas de Lindóia: SBG, 2005. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/51/GP710.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2013.

GARCIA, R.A.V.; RANGEL, P.N.; BRONDANI, C.; MARTINS, W.S.; MELO, L.C.; CARNEIRO, M.S.; BORBA, T.C.O.; BRONDANI, R.P.V. The characterization of a new set of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC Genetics**, London, v.12, n. 5, p.41, 2011.

GONZALEZ, D.; BOWEN, A.J.; CARROLL, T.S.; CONLAN, R.S. The transcription corepressor LEUNIG interacts with the histone deacetylase HDA19 and mediator components MED14 (SWP) and CDK8 (HEN3) to repress transcription. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 27, n. 15, p. 5306-5315, 2007.

GROSS, W.; LENZE, D.; NOWITZKI, U.; WEISKE, J.; SCHNARRENBERGER, C. Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria*. **Gene**, Amsterdam, v. 230, n. 1, p. 7-14, 1999.

HANAI, L.R.; SANTINI, L.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; GEPTS, P.; TSAI, S.M.; VIEIRA, L.M.C. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 25, n. 1, p. 25-45, 2010.

HENNIG, L.; MENGES, M.; MURRAY, J.A.; GRUISSEM, W. *Arabidopsis* transcript profiling on Affymetrix GeneChip arrays. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, n. 4, p. 457-465, 2003.

HERBERT, R.B. Primary and secondary metabolism. In: HERBERT, R.B. (Ed.). **The biosynthesis of secondary metabolites.** London: Chapman & Hall, 1989. p. 1-14.

HINCHA, D.K.; HAGEMANN, M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 383, n. 2, p. 277-283, 2004.

HU, W.-J.; KAWAOKA, A.; TSAI, C.-J.; LUNG, J.; OSAKABE, K.; EBINUMA, H.; CHIANG, V.L. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, n. 9, p. 5407-5412, 1998.

HUAI, J.; ZHENG, J.; WANG, G. Overexpression of a new Cys2/His2 zinc finger protein ZmZF1 from maize confers salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 117-124, 2009.

IHMELS, J.; LEVY, R.; BARKAI, N. Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 1, p. 86-92, 2004.

JIANG, S.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 79-103, 2010.

KIM, D.Y.; KIM, K.K. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 38, n. 3, p. 266-274, 2005.

KIM, Y.J.; ZHENG, B.; YU, Y.; WON, S.Y.; MO, B.; CHEN, X. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 814-822, 2011.

KONISHI, M.; SUGIYAMA, M. A novel plant-specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1 is required for the maintenance of active cell proliferation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 11, p. 591-602, 2006.

LEE, H.K.; CHO, S.K.; SON, O.; XU, Z.; HWANG, I.; KIM, W.T. Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plant. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 622-641, 2009.

LEE, T.I.; RINALDI, N.J.; ROBERT, F.; ODOM, D.T.; BAR-JOSEPH, Z.; GERBER, G.K.; HANNETT, N.M.; HARBISON, C.T.; THOMPSON, C.M.; SIMON, I.; ZEITLINGER, J.; JENNINGS, E.G.; MURRAY, H.L.; GORDON, D.B.; REN, B.; WYRICK, J.J.; TAGNE, J.B.; VOLKERT, T.L.; FRAENKEL, E.; GIFFORD, D.K.;YOUNG, R.A. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, Washington, DC, v. 298, n. 1126, p. 799-804, 2002.

LEVINE, A.; BELENGHI, B.; DAMARI-WEISLER, H.; GRANOT, D. Vesicle associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 49, p. 46284-46289, 2001.

LIU, H.; ZHANG, H.; YANG, Y.; LI, G.; YANG, Y.; WANG, X.; BASNAYAKE, B.; LI, D.; SONG, F. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defence responses against abiotic and biotic stresses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 68, n. 1-2, p. 17-30, 2008.

LIU, X.D.; SHEN, Y.G. NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, *Dunaliella salina*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 569, n. 1-3, p. 337-340, 2004.

MARKHAM, G.D.; PAJARES, M.A. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 4, p. 636-648, 2009.

MATHESON, L.A.; HANTON, S.L.; ROSSI, M.; LATIJNHOUWERS, M.; STEFANO, G.; RENNA, L.; BRANDIZZI, F. Multiple roles of ADP-ribosylation factor 1 in plant cells include spatially regulated recruitment of coatomer and elements of the Golgi matrix. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 4, p. 1615-1627, 2007.

McCONNELL, M.; MAMIDI, S.; LEE, R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M.; PAPA, R.; McCLEAN, P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 121, n. 6, p. 1103-1116, 2010.

MELOTTO, M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; BRUSCHI, A.G.; CAMARGO, L.E.A. Comparative bioinformatic analysis of gene expressed in common bean seedlings. **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 3, p. 562-570, 2005.

MONTERO-TAVERA, V.; RUIZ-MEDRANO, R.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Systemic nature of drought-tolerance in common bean. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 3, n. 9, p. 663-666, 2008.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Water management. In: FAO. **Tropical soybean**: improvement and production. Rome, 1994. p. 153-160. (Plant Production and Protection Series).

PALATNIK, J.F.; ALLEN, E.; WU, X.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; CARRINGTON, J.C.; WEIGEL, D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, London, v. 425, n. 1038, p. 257-263, 2003.

PEJCHAL, R.; LUDWIG, M.L. Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 3, n. 2, p. e31, 2005.

QIN, F.; SAKUMA, Y.; TRAN, L.P.; MARUYAMA, K.; KIDOKORO, S.; FUJITA, Y.; FUJITA, M.; UMEZAWA, T.; SAWANO, Y.; MIYAZONO, K.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 20, n. 6, p. 1693-1707, 2008.

RAVASZ, E.; SOMERA, A.L.; MONGRU, D.A.; OLTVAI, Z.N.; BARABASI, A.L. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. **Science**, Washington, DC, v. 297, n. 1126, p. 1551-1555, 2002.

REDMAN, J.C.; HAAS, B.J.; TANIMOTO, G.; TOWN, C.D. Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 545-561, 2004.

ROBLES, P.; MICOL, J.L.; QUESADA, V. *Arabidopsis* MDA1, a nuclear-encoded protein, functions in chloroplast development and abiotic stress responses. **PLOS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e42924, 2012.

RUTTER, W.J. Evolution of aldolase. **Federation Proceedings for American Society of Biology**, Washington, DC, v. 23, n. 1, p. 1248-1257, 1964.

SCAPIN, G.; REDDY, S.G.; ZHENG, R.; BLANCHARD, J.S. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate reductase in complex with NADH and the inhibitor 2,6-pyridine-dicarboxylate. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 36, n. 49, p. 15081-15088, 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 327-334, 1997.

SIMON, J.P.; IVANOV, I.E.; ADESNIK, M.; SABATINI, D.D. *In vitro* generation from the trans-golgi network of coatomer-coated vesicles containing sialylated vesicular stomatitis virus-G protein. **Methods**, Orlando, v. 20, n. 4, p. 437-454, 2000.

STELLING, J.; KLAMT, S.; BETTENBROCK, K.; SCHUSTER, S.; GILLES, E.D. Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation. **Nature**, London, v. 420, n. 1038, p. 190-193, 2002.

TYLER, L.; BRAGG, J.N.; WU, J.; YANG, X.; TUSKAN, G.A.; VOGEL, J.P. Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 10, p. 600, 2010.

VAN AKEN, O.; ZHANG, B.; CARRIE, C.; UGGALLA, V.; PAYNTER, E.; GIRAUD, E.; WHELAN, J. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 1310-1324, 2009.

VICUNA, D.; MALONE, R.P.; DIX, P.J. Increased tolerance to abiotic stresses in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. **Journal of Plant Sciences**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2011.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 244-253, 2004.

WILSKER, D.; PATSIALOU, A.; DALLAS, P.B.; MORAN, E. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. **Cell Growth and Differentiation**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 95-106, 2002.

XU, C.; HUANG, B. Comparative analysis of drought responsive proteins in Kentucky bluegrass cultivars contrasting in drought tolerance. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2543-2552, 2010.

YANG, X.; SUN, C.; HU, Y.; LIN, Z. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 33, n. 1, p. 103-112, 2008.

ZHANG, G.; MORAIS, M.C.; DAI, J.; ZHANG, W.; DUNAWAY-MARIANO, D.; ALLEN, K.N. Investigation of metal ion binding in phosphonoacetaldehyde hydrolase identifies sequence markers for metal-activated enzymes of the HAD enzyme superfamily. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 43, n. 17, p. 4990-4997, 2004.

ZIMMERMANN, P.; HIRSCH-HOFFMANN, M.; HENNIG, L.; GRUISSEM, W. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 9, p. 2621-2632, 2004.