

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS SOB CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO EM FEIJOEIRO COMUM (*PHASEOLUS VULGARIS*)

BÁRBARA MÜLLER SALOMÃO DE FARIA¹, GEORGIOS JOANNIS PAPPAS JÚNIOR²,
CLEBER MORAIS GUIMARÃES³, PATRÍCIA FERNANDA ZAMBUZZI CARVALHO⁴,
ROSANA PEREIRA VIANELLO⁵

INTRODUÇÃO: O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de consumo humano que se destaca como a mais importante cultivada no mundo inteiro (RAMIREZ VALLEJO; KELLY, 1998). Dentre os fatores climáticos que afetam a agricultura, a seca e a alta temperatura são alguns dos principais problemas para o cultivo do feijoeiro comum e comprometem de modo severo a produção em mais de 1,5 milhões de hectares no mundo (TERAN; SINGH, 2002). A tolerância à seca é uma característica poligênica e envolve mecanismos que atuam de forma isolada ou combinada para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico, o que torna a seca uma característica complexa, de difícil manipulação e compreensão (MULLET; WHITSITT, 1996). Nesse sentido, diversas ações de pesquisa em todo o mundo estão sendo conduzidas com a finalidade de desenvolver novas variedades de feijão mais tolerantes ao déficit hídrico. O feijoeiro comum é particularmente sensível à deficiência hídrica na sua fase vegetativa de florescimento e de enchimento de grãos (KAVAR *et al.*, 2008). Com o intuito de avançar no conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na tolerância à seca, esse estudo teve como objetivos a identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro comum sob condições de déficit hídrico, validação via RT-PCT de alguns desses genes-candidatos potencialmente envolvidos na resposta ao estresse, bem como contribuir para o incremento do banco de sequências expressas (EST's) enriquecidas para genes diferencialmente expressos nos genótipos BAT 477 (tolerante) e Pérola (suscetível) quando submetidos às condições de presença e ausência do déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS: O experimento para a obtenção do tecido vegetal utilizado para a extração de RNA total das plantas submetidas e não submetidas ao tratamento de déficit hídrico foi conduzido em condições de casa de vegetação, na Embrapa Arroz e Feijão, no período de junho a agosto do ano de 2008. O RNA total foi isolado a partir de tecido foliar utilizado o produto comercial *RNAeasy* (*Qiagen*) e utilizado no desenvolvimento de quatro bibliotecas subtrativas de cDNA baseadas na técnica de Análise de Diferença Representacional (RDA) (LISITSYN *et al.*, 1993). Os fragmentos de cDNA foram clonados e sequenciados via estratégia de Sanger em ABI3100 (*Applied Biosystems*). A análise pós-sequenciamento foi realizada através da plataforma *SisGen* (PAPPAS *et al.*, 2008) que avaliou as sequências quanto ao tamanho e qualidade, considerando um número mínimo de 250 pares de base com phred>20, seguido pela análise do nível de redundância das bibliotecas. Os *reads* exclusivos gerados foram comparados com as sequências do *GenBank* pelo sistema de análise, integração e disponibilização de dados utilizando o algoritmo *nr BLASTx*. As sequências exclusivas foram obtidas a partir de análises *in silico* da presença diferencial entre as bibliotecas e as categorias funcionais atribuídas com base no *Gene Ontology*. Foram considerados *clusters* exclusivos sequências com números de *reads* ≥ 5 . A partir de um conjunto de cinco sequências diferencialmente expressas identificadas nos genótipos tolerante e suscetível sob condições de déficit hídrico, denominados de genes-candidatos, foram derivadas *primers* e sondas fluorescente seguindo o critério padrão definidos para sondas *Taqman* sintetizados pela *Applied Biosystems*. Como genes endógenos foram utilizadas as

¹Bióloga, Mestranda em Genética e Melhoramento, UFV, Viçosa, MG, mullerbsf@gmail.com

²Biólogo, Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, gpappas@cenargen.embrapa.br

³Engenheiro Agrônomo, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO, cleber@cnpaf.embrapa.br

⁴Farmacêutica, Pós-doutoranda em Biologia, UFG, Goiânia, GO, patricia.zambuzzi@gmail.com

⁵Bióloga, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO, rosanavb@cnpaf.embrapa.br

sequências do Fator de Elongação 1 α (EF1) e rRNA 18S. As amplificações por PCR foram realizadas utilizando reagente padrão para PCR em tempo real, seguido pela leitura das fluorescências em equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*) e posterior análise dos dados gerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O sequenciamento realizado gerou 9.273 sequências, das quais 7.203 foram válidas, totalizando 81% de aproveitamento médio dos clones. A partir de 37% de sequências únicas, o total de *contigs* e *singletons* formados foram de 439 e 197, respectivamente. A análise *in silico* da presença diferencial de sequências entre as bibliotecas revelou 67 sequências exclusivas que podem ser consideradas genes-alvo envolvidos na resposta da planta ao déficit hídrico. Dessas, 67% dos genes foram identificados na fase de florescimento, enquanto 43% foram expressos nas condições de enchimento de grãos. Considerando que a fase de florescimento é tida como a mais vulnerável em plantas sob deficiência hídrica, espera-se que a expressão de genes para tentar responder a esse estresse seja maior nessa fase e os resultados obtidos corroboram tal hipótese. Em relação às 67 sequências exclusivas, 55% apresentaram similaridade com sequências obtidas sob condições de estresses bióticos e abióticos, sendo que foram identificadas sequências homólogas a 32 espécies diferentes de vegetais com predomínio do grupo das leguminosas. Ao todo, foram atribuídas 10 categorias funcionais às sequências exclusivas, com destaque para a categoria de metabolismo representada por 25% e 18% das sequências da biblioteca Pérola, fase de enchimento de grãos e fase de florescimento, respectivamente, e estimativas de 23% e 30% para o genótipo BAT 477 nas fases de enchimento de grãos e florescimento, respectivamente. As sequências dessa categoria estão relacionadas a produtos gênicos que mantêm processos de síntese e degradação de moléculas, e também permitem o crescimento e reprodução celular, adequando respostas ao ambiente. Assim, muitos desses produtos gênicos estão relacionados a respostas à seca, para que a célula evite ou tolere o estresse. A quantidade de sequências exclusivas com funções desconhecidas e de genes que ainda não foram diretamente relacionados à tolerância a seca foi representada por 45%. Nesse sentido, estudos futuros precisam ser conduzidos a fim de atribuir função biológica aos genes expressos, bem como para ampliar o entendimento dos mecanismos gênicos que potencialmente integram as vias metabólicas das respostas e adaptação do feijoeiro comum em condições de déficit hídrico. Dentre os cinco genes avaliados quanto à expressão diferencial via RT-PCR em tempo real foram avaliados um fator de transcrição denominado DREB (*Dehydration Responsive Element Binding Protein*) responsivo a desidratação, uma proteína induzida por auxinas, uma proteína responsiva ao estresse oxidativo, componente do aparelho fotossintético e uma proteína com função desconhecida, porém com elevados nível de expressão diferencial entre os genótipos contrastantes na condição de déficit hídrico. A partir da verificação das curvas de amplificação definiu-se um limiar de detecção na faixa de amplificação exponencial distinto para cada gene testado e os valores expressos em Δ CT utilizando os endógenos para normalização. Os resultados indicaram alteração na expressão de genes. O fator de transcrição responsivo a desidratação apresentou expressão aumentada no genótipo tolerante em condições de seca na parte aérea da planta, correspondendo ao esperado na resposta do gene DREB. A proteína repressora de auxina apresentou índices elevados de expressão também no genótipo tolerante, porém no tecido radicular. Para a proteína componente do aparelho fotossintético observou-se expressão elevada somente para o genótipo tolerante na presença e ausência do déficit hídrico. Para os demais genes, níveis diferenciais de expressão foram observados no genótipo suscetível, Pérola, nas condições de presença e ausência de estresse.

CONCLUSÕES: Esse estudo possibilitou gerar um amplo número de sequências derivadas de transcritos expressos sob condição de déficit hídrico obtidas a partir de genótipos contrastantes para a tolerância ao estresse de seca. Tais sequências representam alvos potenciais para serem validadas via análise de expressão gênica diferencial e, com base nessa análise, cinco genes-alvos foram avaliados no presente estudo e a expressão dos genes foi detectada em parte aérea e raiz. Os genes associados ao fator de transcrição responsivo a desidratação, estresse oxidativo e indução por auxina apresentaram níveis diferenciais de expressão no genótipo tolerante e representam um avanço no detalhamento dos mecanismos genéticos envolvidos na resposta ao déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J. & MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol Breeding**. v. 21, p. 159–172, 2008.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N. & WIGLER, M. Cloning the Differences Between Two Complex Genomes. **Science**. v.259, p. 946-951, fev, 1993.

MULLET, J. E. & WHITSITT, M. S. Plant cellular responses to water deficit. **Plant Growth Regulation**. v. 20, p. 119-124, 1996.

PAPPAS, G. J. Jr.; MIRANDA, R. P.; MARTINS, N. F.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. C. SisGen: A CORBA Based Data Management Program for DNA Sequencing Projects. **Lecture Notes in Computer Science**. v. 5109, p. 116-123, 2008.

RAMIREZ-VALLEJO, P. I. & KELLY, J. D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**. Netherlands. v. 99, p. 127–136, set., 1998.

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