

Análise do transcriptoma de *Phaseolus vulgaris* em resposta ao déficit hídrico.

MÜLLER, B. S. F.^{1,2}; **PAPPAS**, G. J. JR.³, **COSTA**, M. M. C.³, **PEREIRA**, M.², **GUIMARÃES**, C. M.¹; **ZAMBUZZI-CARVALHO**, P. F.²; **SILVEIRA**, R. D. D.¹, **BRONDANI**, C.¹. & **BRONDANI**, R. P. V.¹

¹ Laboratório de Biotecnologia, EMBRAPA Arroz e Feijão, Goiânia, GO;

² Laboratório de Biologia Molecular, ICB, UFG, Goiânia, GO;

³ Laboratório de Bioinformática, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

E-mail: mullerbsf@gmail.com

Palavras-chave: Feijoeiro comum, tolerância a seca, ESTs, leguminosa.

Introdução:

Os fatores climáticos, como a seca e as altas temperaturas, são alguns dos principais problemas para o cultivo do feijoeiro comum e comprometem a produção em mais de 1,5 milhões de hectares do cultivo no mundo (Teran & Singh, 2002). A deficiência hídrica ocorre geralmente na maioria das regiões produtoras do feijão no Brasil, ocasionando constantes frustrações de safra, sendo a floração a fase mais vulnerável, seguida pelo período do enchimento de grãos (Embrapa, 2010). Em condições de seca, o cultivo do feijoeiro comum sofre severa queda de produtividade, além de se tornar altamente vulnerável ao ataque de doenças.

O feijoeiro comum destaca-se como uma cultura de grande valor nutricional (Broughton *et al.*, 2003), e como alimento acessível às populações de baixa renda. Contrariamente ao observado para culturas de grande interesse internacional, o cultivo do feijão no Brasil ocorre principalmente em pequenas propriedades que utilizam baixo nível tecnológico no processo produtivo, estando inserido em uma cadeia produtiva que provê o sustento de milhares de famílias de pequenos agricultores que, em conjunto, contribuem para o fortalecimento do agronegócio nacional. A demanda constante por cultivares mais produtivas, com melhor qualidade de grão, resistência às principais doenças e tolerantes à estresses

bióticos, estando adaptadas aos variados ambientes de cultivo, tem dado foco ao programa de melhoramento do feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão.

Com o intuito de avançar no conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na tolerância à seca, esse estudo prevê identificação de genes-candidatos envolvidos na resposta ao déficit hídrico, bem como contribuir para o estabelecimento de um banco de sequências-alvo expressas (ESTs) que sejam públicas e 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 e RNA foi conduzido em casa de vegetação, da Embrapa Arroz e Feijão, na presença e ausência de déficit hídrico na fase de florescimento e enchimento de grãos das plantas. Foram construídas quatro bibliotecas subtrativas de cDNA, baseadas na Análise de Diferença Representacional (RDA), método que analisa as diferenças nas sequências expressas entre os dois genótipos.

A análise pós-sequenciamento, utilizando o *software* *SisGen* (PAPPAS *et al.*, 2008), baseou-se na seleção das sequências quanto ao tamanho e qualidade, sendo consideradas como válidas aquelas com um número mínimo de 250 pares de base com $\text{phred} > 20$, e foi realizada uma análise do nível de redundância das bibliotecas. As sequências válidas foram submetida ao processo de anotação genômica utilizando o algoritmo *BLASTnr* contra diversos bancos de dados (*GenBank*, TAIR - *Arabidopsis thaliana*, *PlantGDB* - *Glycine max* e TIGR *Rice Genome* - *Oryza sativa*). As sequências exclusivas, com o $E\text{-value} \leq 5$, foram obtidas a partir de análises *in silico* da presença diferencial entre as bibliotecas. Categorias funcionais, baseadas no *Gene Ontology* – Processos Biológicos foram atribuídas às sequências exclusivas. Foram considerados *clusters* exclusivos sequências com números de *reads* ≥ 5 .

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 *clusters* e *singletons* formados foram de 384 e 174, respectivamente.

As análises *in silico* da presença diferencial de sequências entre as bibliotecas revelaram 69 sequências exclusivas, provavelmente responsáveis pelas diferenças entre os genótipos e sua resposta ao déficit hídrico. Em relação à primeira biblioteca (Pérola – Enchimento de Grãos), 25% das sequências exclusivas se mostraram similares a produtos gênicos envolvidos no ciclo celular; 9% correspondem a genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 8% estão associados à componente do fotossistema; 25% estão relacionados com o metabolismo; 8% a proteínas não classificadas e 25% estão relacionadas com a transcrição. A segunda biblioteca (BAT 477 – Enchimento de Grãos) possui 6% das sequências exclusivas similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 23% às sequências do fotossistema; 23% às sequências do metabolismo; 3% às sequências de proteínas não classificadas; 39% à síntese de proteínas e 6% à transcrição. Com relação às sequências da terceira biblioteca (Pérola – Florescimento), 59% se mostraram similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 15% a componente do fotossistema; 7% ao metabolismo; 4% a proteína hipotética; 7% a proteínas não classificadas; 4% a síntese de proteínas e 4% a transporte e proteínas de membrana. Já as sequências da quarta biblioteca (BAT 477 – Florescimento), 13% se mostraram similares às sequências de genes envolvidos na defesa da célula e virulência; 17% as sequências de componentes do fotossistema; 29% ao metabolismo; 8% a proteínas não classificadas; 8% à sinalização celular; 21% à síntese de proteínas e 4% ao transporte e proteína de membrana.

As sequências exclusivas, obtidas para *Phaseolus vulgaris*, apresentaram maiores índices de homologia com sequências de *Glycine max* (90,25%), seguido por *A. thaliana* (88,75%) e *Oryza sativa* (72,75%). Em relação às 69 sequências exclusivas, 37 foram diferencialmente expressas na variedade tolerante (BAT477), com 19 predominantes na fase de floração e 18 no enchimento de grãos. Das 37

sequências, 17 foram consideradas *clusters* exclusivos, com média do número de *reads* 14 vezes maior em relação aos demais. Já em relação à variedade suscetível (Pérola) 32 sequências foram diferencialmente expressas, sendo 22 predominantes na fase de floração e 10 no enchimento de grãos, além de 12 *clusters* exclusivos serem identificados de acordo com o critério de estrigência adotado.

Em relação às 69 sequências exclusivas, 40% apresentaram similaridade com sequências obtidas sob condições de estresse, permitindo inferir que o procedimento adotado foi satisfatório quanto à filtragem para genes responsivos ao déficit hídrico. Foram identificadas regiões genômicas contendo genes de grande interesse econômico, como por exemplo, fragmentos relacionados às proteínas reprimidas por auxinas, relacionados às respostas a desidratação e à resposta ao estresse oxidativo.

Conclusão:

Um conjunto de sequências-alvo diferencialmente expressas nas condições de déficit hídrico foi identificado, a partir de experimento com genótipos de feijoeiro tolerante e suscetível ao estresse, para as quais foram derivados oligonucleotídeos iniciadores visando a busca por SNPs entre os parentais de uma população para tolerância à seca, seguido por mapeamento e análise de QTLs.

Para os ESTs cujo processo de anotação resultou na identificação de sequências com similaridade significativa a genes envolvidos em resposta a estresses, assim como para ESTs sem função definida, porém com número de *reads* ≥ 5 , será conduzida uma análise de qRT-PCR, objetivando a validação e quantificação da expressão gênica.

Todas as sequências transcritas exclusivas geradas para *Phaseolus vulgaris* serão disponibilizadas e compartilhadas através de bancos de dados públicos, tornando-as acessíveis para fins de pesquisa em âmbito mundial.

Referências Bibliográficas:

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

EMBRAPA - Sistemas de produção do feijoeiro, Cultivo do Feijoeiro comum, Importância Econômica e Clima. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijao/feijao.htm>>. Acesso em: 06 de setembro de 2010.

GEPTS, P.; BEAVIS, W.D.; BRUMMER, E.C.; SHOEMAKER, R.C.; et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiol**, v. 137, p. 1228-1235, 2005.

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.

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.

Recursos financeiros: *Macroprograma Embrapa/Monsanto e CNPq.*