

## TRANSCRIPTOMA SUPERSAGE DE FEIJÃO-CAUPI SOB DESIDRATAÇÃO RADICULAR

**Carolina Basante<sup>1</sup>; José R. Costa Ferreira Neto<sup>2</sup>; Valesca Pandolfi<sup>2</sup>; Kaesel J. Damasceno e Silva<sup>3</sup>,  
Maurisrael de M. Rocha<sup>3</sup>; Alexandre Nepomuceno<sup>4</sup>; Rosana P. V. Brondani<sup>5</sup>; Ana M. Benko-Iseppon<sup>2</sup>;  
Ederson A. Kido<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bióloga, graduanda, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, Recife, PE. E-mail:  
carol.basante@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo S/N, Recife, PE.

<sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Teresina, PI.

<sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Londrina, PR.

<sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Arroz e feijão, Rodovia GO-462, km 12, Sto Antônio de Goiás, GO.

**Resumo** – O feijão-caupi é uma planta de ampla plasticidade fenotípica, podendo produzir mesmo em condições não satisfatória para outras culturas. Assim, identificar genes estresse responsivo nesta cultura é de vital importância, tanto para a espécie quanto para outras leguminosas. Estudos em transcriptômica, proporcionados pela técnica SuperSAGE, origina *tags* de 26 pb que podem ser quantificadas e estatisticamente analisadas, sendo classificadas em superexpressas ou reprimidas. *Unitags* (*tags* diferentes) de raízes de feijão-caupi submetidas a estresse de desidratação radicular (de até 150 min, após exposição ao ar) foram analisadas procurando-se identificar *unitags* diferencialmente expressas nas respostas dos genótipos analisados, considerados tolerante e sensível a seca. As anotações de gene/ função das *unitags*, associadas à regulação (induzida ou reprimida nas bibliotecas sob estresse em relação às bibliotecas controle) permitiram identificar alvos moleculares com potencial para desenvolvimento de marcadores moleculares e ou estudos de transgenia, visando uso futuro em programas de melhoramentos da espécie e de leguminosas relacionadas.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, estresse abiótico, genômica, bioinformática

### Introdução

O feijão-caupi é uma das 23 espécies cultivadas mais importantes, ocupando cerca de 14 milhões de hectares distribuídos pela Ásia, África, sul da Europa e Américas Central e do Sul. Devido à plasticidade fenotípica de seus genótipos, uma das principais características da espécie, a cultura é umas das mais cultivadas em sistemas agrícolas tradicionais em regiões semi-áridas, em decorrência de sua adaptabilidade à seca e altas temperaturas. Também é capaz de tolerar solos ácidos e alcalinos, além daqueles de baixa fertilidade e/ou salinos (ELOWAD & HALL, 1987; FERY, 1990). Devido a essa plasticidade produtiva sob as mais diversas condições ambientais, ela ainda contribui atenuando perdas econômicas de outras culturas, por ocasião de plantio em períodos desfavoráveis (DADSON *et al.*, 2005), além de ser importante componente da agricultura de subsistência em países pobres e em desenvolvimento (SINGH *et al.*, 2003). Dessa maneira, o feijão-caupi constitui em excelente fonte de genes para tolerância a estresses ambientais, por conter um *pool* gênico tão diverso e eficiente na manutenção de sua biologia, mesmo nas mais adversas condições.

A Rede NordEST representa um esforço conjunto de diversas instituições em realizar a genômica funcional do feijão-caupi, através de estudos abrangendo estresses abióticos (desidratação radicular e exposição ao sal NaCl), com sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) e *tags* SuperSAGE (*SuperSerial Analysis of Gene Expression*). A técnica SuperSAGE representa uma das mais eficientes para análises de transcriptomas (TERAUCHI *et al.*, 2008). O emprego dessa técnica, na identificação de genes estresse-responsivos proporcionará melhor entendimento dos mecanismos envolvidos, com possibilidades de aplicações no melhoramento da espécie. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar diferentes bibliotecas SuperSAGE, do transcriptoma de raízes de feijão-caupi submetido a estresse salino (100 mM NaCl) e desidratação de até 150 min., após suspensão de raízes de sistema hidropônico de cultivo, visando identificar transcritos comuns e exclusivos em resposta a cada estresse.

### Material e Métodos

As *tags* disponíveis para o trabalho foram geradas de bibliotecas SuperSAGE oriundas de genótipos sensível e tolerante a seca (Santo Inácio e o Pingo de Ouro, respectivamente, selecionados pela Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI), em experimento de desidratação radicular com exposição ao ar, com coleta de amostras de raízes a cada 25 minutos (até 150 minutos), após suspensão de cultivo em solução hidropônica, em casa de vegetação (plantas de 3 meses de idade, em experimento conduzido na Embrapa Soja, em Londrina, PR). As bibliotecas SuperSAGE foram geradas conforme Molina *et al.* (2008), a partir de RNA total extraídas das raízes amostradas, tendo sido as *tags* sequenciadas por intermédio da empresa GenXPro GmHb (Frankfurt, Alemanha). *Tags* foram analisadas com auxílio do software DiscoverySpace 4.0 (Robertson *et al.*, 2007) e classificadas em induzidas ou reprimidas, ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). *Unitags* (*tags* diferentes) foram ancoradas (BlastN) em ESTs de feijão-caupi clusterizadas pela rede NordEST e anotadas a partir de transcritos de *Phaseolus vulgaris* da base de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Foram considerados somente alinhamentos BlastN (*tag* – EST) perfeitos ou com somente um erro em 26 pb (TSM), não podendo este ocorrer nas quatro bases iniciais que caracteriza a *tag* (CATG).

### Resultados e Discussão

Os totais de *tags* por bibliotecas SuperSAGE de raízes de feijão-caupi sob desidratação radicular ou não (controle negativo) geradas dos genótipos Pingo de Ouro (tolerante ao estresse) e Santo Inácio (sensível) podem ser vistos na Tabela 1. Essa quantidade permite gerar um padrão compreensível do transcriptoma de feijão-caupi sob o estresse estudado.

**Tabela 1.** Total de *tags* por bibliotecas SuperSAGE de raízes de feijão-caupi sob desidratação radicular (de até 150 min) ou não (controle negativo), geradas a partir dos genótipos (G) Pingo de Ouro (P, tolerante) e Santo Inácio (I, sensível ao estresse).

Bib	G	Desidratação radicular	Total de <i>tags</i>
RIT	I	Bulk de seis tempos de exposição (de 25 até 150 min)	6.626.421
RIO	I	Controle negativo	8.010.394
RPT	P	Bulk de seis tempos de exposição (de 25 até 150 min)	9.554.014
RPO	P	Controle negativo	2.076.361

As *tags* representaram 149.305 *tags* diferentes (*unitags*), cujas análises estatísticas para identificar aquelas diferencialmente expressas [induzidas (UR) e reprimidas (DR);  $p < 0,05$ ] nos dois contrastes principais (T: genótipo tolerante sob estresse *versus* respectivo controle negativo; S: genótipo sensível sob estresse *versus* respectivo controle negativo, contraste S) podem ser vistos na Tabela 2, bem como os e totais dessas *unitags* que alinharam com no máximo um *mismatch* (TSM) com ESTs da espécie (database: NordEST), o que permitiria melhor anotação e pronto uso da informação, como para desenhos de *primers* visando futura validação.

**Tabela 2.** Totais de *unitags* SuperSAGE induzidas (UR), reprimidas (DR) e não significativas (ns;  $p < 0,05$ ) de acordo com o contraste (T: genótipo tolerante sob estresse *versus* sem estresse; S: genótipo sensível sob estresse *versus* sem estresse) e totais dessas *unitags* que alinharam com no máximo um *mismatch* (TSM) com ESTs da espécie (database: NordEST).

<i>Unitags</i>	Totais		TSM	
	T	S	T	S
UR	17559	23956	9437	9014
DR	30402	23358	5413	10570
Ns	80199	70632	21470	17244
Total	128160	117946	36320	36828

Considerando as *unitags* diferencialmente expressas em cada contraste foi possível, através de diagramas de Venn, quantificar aquelas comuns aos dois contrastes principais, bem como aquelas exclusivas de cada um, além de verificar o tipo de regulação observada em cada situação [induzida ou UR (*up-regulated*) e reprimida ou DR (*down-regulated*)]. Desta forma, 4505 *unitags* consideradas induzidas no tolerante após aplicação do estresse [UR(T)] foram consideradas reprimidas no sensível após a aplicação do mesmo estresse [DR(S)] (Figura 1A). Para essas *unitags*, 2355 ESTs de feijão-caupi, que apresentaram no máximo um erro no alinhamento BlastN estão disponíveis (Figura 1B). De modo análogo, 988 *unitags* DR no tolerante [DR(T)] foram UR no sensível [UR(S)] (Figura 1A), sendo que para estas *unitags*, 456 ESTs encontram-se disponíveis, tendo sido alinhadas com até um erro (Figura 1B). Isso demonstra o potencial da técnica em discriminar os dois genótipos quanto à resposta ao estresse aplicado e quanto a possibilidade de identificação de genes e transcritos diferencialmente expressos e/ou regulados e, ao mesmo tempo, em verificar a quantidade de ESTs ancorando *unitags* disponíveis prontamente para estudos complementares.

Um resumo do quantitativo de *unitags* anotadas para famílias gênicas ou alvos moleculares interessantes para trabalhos futuros pode ser visto na Tabela 3. Nessa tabela, observa-se, para as diferentes proteínas, um número expressivo de ESTs de feijão-caupi contendo *unitags* ancoradas, bem como de *unitags* induzidas (UR) ou reprimidas (DR), observadas nas respostas dos dois genótipos [Pingo de Ouro (tolerante) e Santo Inácio (sensível)], quando estes foram submetidos ao estresse (em comparação com a expressão dos respectivos controles negativo). Isso novamente ressalta o potencial dos dados para o encontro de genes responsivos ao estresse aplicado, sendo que muitos desses podem ser úteis em programas de melhoramento, não somente de feijão-caupi, mas também de outras leguminosas, após as devidas validações de suas expressões, etapa na qual se encontra o projeto.

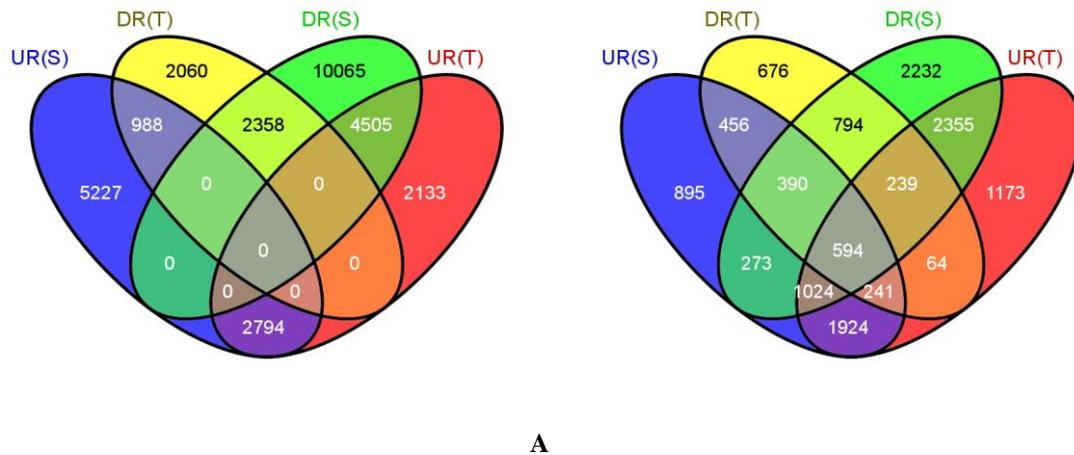


Figura 1. Diagramas de Venn com (A) totais de *tags* SuperSAGE induzidas (UR) e reprimidas (DR;  $p < 0,05$ ), de raízes de feijão-caupi sob estresse hídrico (desidratação radicular de até 150 minutos), dos contrastes T (genótipo tolerante Pingo de Ouro, sob estresse *versus* sem estresse) e S (genótipo sensível Sto Inácio, sob estresse *versus* sem estresse), e (B) com ESTs de feijão-caupi portando *unitags* UR ou DR (até um *mismatch* em alinhamentos BlastN) observadas nos mesmos contrastes T e S.

**Tabela 3.** Resultados de buscas por palavras-chave em *unitags* (de raízes de feijão-caupi sob desidratação radicular de até 150 minutos) anotadas, parcela dessas *unitags* ancoradas em ESTs de feijão-caupi (máximo de um erro no alinhamento blastN) e subtotais dessas *unitags* induzidas (UR) e reprimidas (DR;  $p < 0,05$ ) observadas no contraste T (genótipo tolerante Pingo de Ouro sob estresse *versus* sem estresse) e S (genótipo sensível Santo Inácio sob estresse *versus* sem estresse).

Alvo	<i>Unitags</i>	ESTs	UR (T)	DR (T)	UR (S)	DR (S)
<i>Transcription Factors</i>	1132	493	115	73	92	132
<i>Kinase</i>	2773	1980	477	213	447	463
<i>Chaperone</i>	329	207	29	34	41	40
<i>Heat Shock Protein</i>	492	374	40	48	46	83
<i>PIP aquaporin</i>	258	249	40	71	65	61
<i>Lipoxygenase</i>	107	73	22	2	23	4
<i>LEA</i>	91	72	23	13	30	9
<i>Ubiquitin relatives</i>	763	523	111	70	30	41

### Conclusões

As análises permitiram identificar *tags* SuperSAGE diferencialmente expressas nos genótipos tolerante e sensível após a aplicação do estresse (de desidratação radicular de até 150 min), bem como identificar transcritos de feijão-caupi (ESTs) ancorando essas *unitags*. A anotação permitiu identificar classes de proteínas interessantes para estudos futuros, que associadas com dados de regulação e expressão, irão permitir selecionar alvos moleculares que possam ser úteis no melhoramento genético de feijão-caupi e outras leguminosas, sejam como marcadores moleculares funcionais ou para estudos de transgenia.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa e ao CNPq, pelo financiamento e bolsas, e as unidades Embrapa Arroz e feijão, Embrapa Meio-Norte e Embrapa Soja pelos apoios diversos de seus pesquisadores e coordenadores.

### Referências

- MOLINA, C.; ROTTER, B.; HORRES, R.; UDUPA, S.M.; BESSER, B.; BELLARMINO, L.; BAUM, M.; MATSUMURA, H.; TERAUCHI, R.; KAHL, G.; WINTER, P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics*, v.9, n.1, p.553-580, 2008.
- ROBERTSON, N.M.; OVEISI-FORDOREI, S.D.; VARHOL, R.J.; FJELL, C.; MARRA, M.; JONES, S., SIDDIQUI, A. DiscoverySpace: an interactive data analysis application. *Genome Biology*. v. 8, n. 1, R6, 2007.
- TERAUCHI, R.; MATSUMURA, H.; KRÜGER, D. H.; KAHL, G. SuperSAGE: The most advanced transcriptoma technology for functional genomics. In: KAHL, G.; MEKSEM, K. (eds.). **The handbook of plant functional genomics**. 1ª ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, cap. 3, p. 37-54, 2008.
- FERY, R.L. The cowpea: production, utilization, and research in United States. *Horticulture Review* , v. 12, p. 197-222, 1990.
- ELOWAD, H.O.A. & HALL, A.E. Influences of early and late nitrogen fertilization on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry field conditions. *Field Crops Research*, v.15, p. 229-244, 1987.
- DADSON, R.B.; HASHEM, F.M.; JAVAID, I.; JOSHI, J. ALLEN, A.L.; DEVINE, T.E. Effect of water stress on the yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Delmarva region of the United States. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v.191, p.210-217, 2005.
- SINGH, B.B.; AJEIBE, H.A.; TARAWALI, S.A.; FERNANDEZ-RIVERA, S.; ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crop Research*, v.84, p.169-177, 2003.