

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

NAINE MARTINS DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
EXPRESSÃO GÊNICA EM FEIJÃO SUBMETIDO À CONDIÇÃO DE
ESTRESSE HÍDRICO**

LAGES, SC

2011

NAINÉ MARTINS DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
EXPRESSÃO GÊNICA EM FEIJÃO SUBMETIDO À CONDIÇÃO DE
ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Orientador: Dr. Jefferson Luís Meirelles
Coimbra

Co-orientador: Dr. Altamir Frederico
Guidolin

Co-orientador: Dr. Mauricio Marini Kopp

Co-orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia

LAGES, SC

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Vale, Naine Martins do
Caracterização morfológica e molecular da expressão gênica em feijão
submetido à condição de estresse hídrico / Naine Martins do Vale;
orientador: Jefferson Luís Meirelles Coimbra. – Lages, 2011.
66f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. Estresse hídrico. 3. Expressão
gênica. I. Título.

CDD – 635.652

NAINE MARTINS DO VALE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
EXPRESSÃO GÊNICA EM FEIJÃO SUBMETIDO À CONDIÇÃO DE
ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Homologada em: ____/____/____

Orientador/presidente: Dr. Jefferson Luís
Meirelles Coimbra (UDESC/Lages - SC)

Dr. Leo Rufato
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado
em Produção Vegetal e Coordenador do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Agrárias - UDESC/Lages - SC

Co-orientador/membro: Dr. Altamir
Frederico Guidolin (UDESC/Lages - SC)

Co-orientador/membro: Dr. Mauricio
Marini Kopp (Embrapa/Bagé - RS)

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias - UDESC/Lages - SC

Membro: Dr. Antonio Costa Oliveira
(UFPEL/Pelotas - RS)

Lages, Santa Catarina, 15 de Julho de 2011

Dedico
Aos meus pais
Odete e Jorge

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus pais...

A minha mãe e ao meu pai que sempre estiveram presente, me incentivando em todos os momentos e mais que tudo acreditando e me apoiando incondicionalmente, sem eles esses momentos não seria possível.

A Leiri, pela amizade inquestionável, carinho, compreensão, broncas e todo o incentivo durante todo o tempo de faculdade e principalmente pela parceria durante o mestrado.

Aos professores Jefferson e Altamir pela amizade, pela convivência durante todos esse anos , por toda a transmissão de conhecimento, por todas as broncas que incentivaram o crescimento pessoal e principalmente por todos os momentos de alegria.

Aos co-orientadores Mauricio e Marcelo por toda auxílio durante toda a execução do projeto, por sempre estarem prontos a ajudar solucionar as dúvidas e em especial ao Mauricio que desde o início participou na construção dessa idéia.

Aos colegas do grupo IMEGEM: Juliano, Diego, Fabiani, Carmelice, Diane, Patric, Joice e Luciano, obrigada pelo apoio.

Aos amigas do Laboratório Edi e Jaque, por toda ajuda, transmissão de conhecimento, pelas palavras de incentivo, amizade e por todos os momentos de alegria.

Ao CAV/UEDESC- pela disponibilidade da realização do mestrado.

E por todos que de alguma forma contribuíram para este momento, durante toda a minha caminhada

Obrigada!

RESUMO

VALE, Naine Martins. **Caracterização morfológica e molecular da expressão gênica em feijão submetido à condição de estresse hídrico**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

Considerando o feijão uma espécie pouco tolerante ao estresse hídrico, o qual ocasiona grandes perdas no rendimento de grãos, os programas de melhoramento buscam aliar os métodos convencionais com as técnicas de biologia molecular, para desenvolver genótipos tolerantes ao estresse hídrico e reduzir os danos em decorrência desse estresse. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e classificar os genótipos de feijão em tolerantes e sensíveis ao estresse, construir uma biblioteca de cDNA diferencialmente expressos dos genótipos discriminados, seqüenciar os fragmentos das bibliotecas e determinar quais são os responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico em feijão no período do florescimento. Para a caracterização foram utilizados nove genótipos (IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri e IPR Juriti, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru). Eles foram submetidos a duas condições hídricas: 1) irrigação conforme a necessidade da cultura e 2) estresse hídrico no período do florescimento por um período de 15 dias. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Foram avaliadas: *i*) Estatura da planta; *ii*) Diâmetro do caule; *iii*) Número de legumes por planta; *iv*) Número de grãos por legume; *v*) Comprimento da raiz e *vi*) Massa seca da raiz. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Os resultados mostram que o caráter diâmetro do caule não discrimina os genótipos de feijão em tolerantes e sensíveis à falta de água. O genótipo Pérola foi classificado como tolerante ao estresse hídrico no período do florescimento. Já o IAPAR 81 e IPR Juriti foram classificados como sensíveis. As folhas do Pérola e IAPAR 81 da condição normal de irrigação e de estresse foram utilizados para a extração de RNA. A partir dos RNA's obtidos, iniciou-se a hibridização subtrativa supressiva (SSH) utilizando-se o kit PCR Select cDNA Subtraction Kit. Após a hibridização, os fragmentos diferencialmente expressos foram clonados utilizando-se o Kit pGEM[®]-T. Após a clonagem e transformação utilizando a *E.coli*, o plasmídeo recombinante foi retirado da bactéria utilizando-se o método da lise alcalina. Os clones foram seqüenciados com o Kit BigDye. Os eletroferogramas obtidos foram analisados em programas computacionais e as seqüências foram comparadas no Genbank. O genótipo Pérola apresentou expressão diferencial de genes induzidos em resposta ao estresse, os quais lhe conferem a tolerância. O genótipo IAPAR 81 também expressa genes em condição de estresse, no entanto, estes não lhe conferem tolerância ao estresse hídrico. A partir disso podemos concluir que a técnica da SSH foi eficiente no isolamento de fragmentos de genes diferencialmente expressos nos genótipos Pérola e IAPAR 81, possibilitando a construção de duas bibliotecas de cDNA que correspondem a esses genes. O seqüenciamento de 81 clones permitiu encontrar 35 seqüências diferencialmente expressas no genótipo Pérola em resposta ao déficit hídrico e dessas, nove correspondem a possíveis novos genes relacionados a tolerância ao estresse hídrico em feijão.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Estresse Hídrico. Expressão Gênica.

ABSTRACT

VALE, Naine Martins. **Morphological and molecular characterization of gene expression in common bean under the condition of water stress.** 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

The bean is a species with little tolerance to water stress, suffering great losses in grain yield. Therefore, the breeding programs seek to combine conventional methods with molecular biology techniques, to develop genotypes tolerant to water stress and so reduce damage due to this stress. This study aimed to evaluate and classify the genotypes of beans in tolerant and sensitive to stress, build a library of differentially expressed cDNA of discriminated genotypes, to sequence fragments of the library and figure out which genes are responsible for tolerance to water stress in beans in the period of flowering. To this characterization, nine genotypes were used (IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri e IPR Juriti, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru). The genotypes were subjected to two water conditions: 1) irrigation according to crop need and, 2) water stress during flowering for a period of 15 days. The experimental design used was randomized blocks with three replications. Were evaluated: i) Plant height; ii) Diameter of the stem; iii) Number of vegetables per plant; iv) Number of grains per pod, v) Length of the root and vi) Root dry mass. The data were analyzed using ANOVA and means comparison tests. The results showed that the stem diameter does not discriminate in bean, the genotypes tolerant and sensitive to water shortages. The Pérola genotype was classified as tolerant to water stress during flowering and should be included in block crossings breeding programs. Already, the IAPAR 81 and IPR Juriti were classified as sensitive. The Pérola and IAPAR 81 genotypes were used for RNA extraction. From the obtained RNA's, began the suppressive subtractive hybridization (SSH) using the PCR Select cDNA Subtraction Kit Kit. After hybridization, the differentially expressed fragments were cloned using the pGEM ®-T kit. After cloning and transformation using *E. coli*, the recombinant plasmid was removed from the bacteria using the alkaline lysis method. Then the clones were sequenced with the BigDye kit. The electropherograms were evaluated in appropriated softwares and the sequences were compared to those in Genbank. The Pérola genotype presented differential expression of genes induced in response to stress, which confer tolerance to the plant. Genotype IAPAR 81 also expresses genes under conditions of stress, however, these do not confer tolerance to drought stress. From this, we can conclude that the SSH technique was effective in isolating fragments of differentially expressed genes in genotypes Pérola and IAPAR 81, been possible the construction of two libraries with cDNA fragments that express these genes. The sequencing of 81 clones allowed us to find 35 differentially expressed sequences in the genotype Pérola in response to water deficit and of those, nine correspond to possible novel genes related to tolerance to water stress in beans.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Water Stress. Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Dendrograma referente aos nove genótipos de feijão comum que foram submetidos ao estresse hídrico, utilizando o índice de dissimilaridade de Mahalanobis (D^2) por meio do método de agrupamento UPGMA.....	21
Figura 2 -	Dendrograma referente aos nove genótipos de feijão comum que foram não submetidos ao estresse hídrico, utilizando o índice de dissimilaridade de Mahalanobis (D^2) por meio do método de agrupamento UPGMA.....	22
Figura 3 -	Hibridação subtrativa, tipos de moléculas: (a e a') cDNA teste com adaptador 1; (b e b') moléculas pouco abundantes que só se expressam em condição de estresse; (c e c') reparamento das fitas originais; (d e d') moléculas teste e controle homologas, que se expressam nas duas condições e (e e e') moléculas controle homologas; (f e f') moléculas controle pouco abundantes e (g) cDNA teste hibridizado com os dois adaptadores... ..	33
Figura 4 -	Esquema representando as seqüência resultantes da Reação de PCR, formação de diferentes tipos de moléculas: (a e a') moléculas não hibridizadas com adaptador em uma das pontas; (b e b') moléculas hibridizadas com adaptador nas duas pontas; (c e c') moléculas hibridizadas com adaptador nas duas pontas; (d) moléculas hibridizadas e não hibridizadas sem adaptador; (e) moléculas hibridizadas com adaptador diferentes em cada ponta; (f) moléculas do tipo 5 que possuem ligação para os dois primers e (g) moléculas do tipo em forma estável.	34
Figura 5 -	Perfil eletroforético de RNA total, extraído com Trizol , das amostras de feijão. a. Genótipo pérola na condição normal de irrigação; b. Genótipo pérola na condição de estresse hídrico; c. Genótipo IAPAR 81 na condição normal de irrigação; d. Genótipo IAPAR 81 na condição de estresse hídrico.....	39
Figura 6 -	Produtos de PCR da hibridização subtrativa supressiva em gel de agarose 2%. a. Marcador de peso molecular de 100 pb; b. Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo Pérola; c Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo IAPAR 81; d. Produto do segundo PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo Pérola; 5. Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo IAPAR 81... ..	40
Figura 7-	Colônias brancas de E. coli, contendo o plasmídeo recombinante; o inserto corresponde aos genes diferencialmente expressos do genótipo Pérola.. ..	42

Figura 8- Perfil eletroforético de DNA plasmidial isolado de clones contendo cDNA. (a) padrão de peso molecular de 100 pb; (b,c,d,e e) genótipo pérola e (f,g,h,e i) genótipo IAPAR 81..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de variância para os nove genótipos submetidos a duas condições de potencial hídrico do solo, para as variáveis, estatura (EST), diâmetro do caule (DC), número de legumes por planta (NLP), número de grãos por legume (NGL), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR).	19
Tabela 2 -	Teste de médias para os nove genótipos submetidos a estresse hídrico, para as variáveis, estatura de planta (EST) em m, diâmetro do caule (DC) em m, número de legumes por planta (NLP), número de grãos por legume (NGL), comprimento da raiz (CR) em m massa seca da raiz (MSR) em kg.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2	CAPÍTULO I: <i>SCREENING DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO</i>	15
2.1	RESUMO	15
2.2	ABSTRACT	15
2.3	INTRODUÇÃO	16
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.5	RESULTADOS.....	19
2.6	DISCUSSÃO	23
2.7	CONCLUSÃO.....	26
3	CAPÍTULO II: BIBLIOTECA DE GENES QUE CONDICIONAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO	27
3.1	RESUMO	27
3.2	ABSTRACT.....	28
3.3	INTRODUÇÃO	28
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.6	CONCLUSÃO	45
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICES	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um dos grãos de maior importância para a alimentação humana, representando a principal leguminosa cultivada nas Américas como fonte de proteínas. Em todo o mundo, são plantados cerca de 26 milhões de hectares com feijão (FAO, 2011), entretanto, o rendimento é normalmente baixo devido principalmente a escassez de água no solo (SINGH et al., 1995).

O déficit hídrico para a cultura do feijão torna-se mais relevante quando nos deparamos com o cenário mundial de mudanças climáticas. Estima-se que essas mudanças tragam um incremento nos estresses bióticos e abióticos, porém os efeitos dos abióticos são mais pronunciados, especialmente o aumento da temperatura e redução na precipitação pluviométrica (BATES et al., 2008).

Considerando que o feijão é uma espécie pouco tolerante ao estresse hídrico, onde cerca de 60% da perda de rendimento de grãos é devido a seca (MOLINA et al., 2001), fica fácil compreender por que e como as mudanças climáticas, em especial a escassez de chuvas, reduzem de forma significativa o potencial produtivo do feijão, culminando em prejuízos principalmente para os pequenos produtores, que não utilizam sistemas de irrigação artificial, gerando um aumento expressivo no preço do produto para os consumidores. O estresse hídrico torna-se mais grave quando ocorre durante a fase reprodutiva do feijão, pois causa significativa redução no rendimento de grãos (PIMENTEL et al., 1999), que é a fase de maior sensibilidade da cultura.

Com o objetivo de diminuir os efeitos negativos deste tipo de estresse no feijão, práticas de manejo como irrigação artificial são de grande valia, no entanto, o desenvolvimento de cultivares tolerantes é a estratégia mais eficiente e econômica (SOUZA et al., 2003). Desta forma pode ser utilizadas por pequenos e grandes produtores, ao contrário dos sistemas de irrigação, os quais são na maioria acessíveis somente aos grandes produtores. Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares de feijão tolerantes a falta de água, merece atenção especial nos programas de melhoramento, pois somente assim, após um período inesperado de déficit hídrico, um

rendimento de grãos sustentável pode ser obtido pela utilização destas cultivares tolerantes.

Com o intuito de desenvolver cultivares de feijão tolerantes ao estresse hídrico, os melhoristas de plantas buscam entender os processos de tolerância para então, manipular a variabilidade genética e desenvolver estas cultivares. Para esta finalidade as ferramentas da biotecnologia podem ser utilizadas, pois agregam aos programas de melhoramento maior rapidez e confiabilidade na obtenção de cultivares de feijão tolerantes ao estresse hídrico. Para tanto, a caracterização de genótipos tolerantes ou sensíveis à seca é um pré-requisito para a seleção e manipulação genética (TURNER, 1997), bem como para o estudo dos genes responsáveis pela tolerância ao estresse. A possibilidade de utilizar genótipos previamente caracterizados fenotipicamente para estudos de genes, torna-se possível porque o padrão de expressão gênica em feijão submetidos à seca coincide com as modificações morfológicas e fisiológicas observadas nas plantas tolerantes e sensíveis (MICHELETTO et al., 2007). A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada para o estudo dos mecanismos de tolerância (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996).

Uma poderosa ferramenta da biotecnologia para a prospecção desses genes são as coleções de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs), pois os estudos de expressão gênica tornaram-se muito importantes na busca de genes que atuam diretamente na fisiologia do estresse (SEKI et al., 2002) e essas sequências são a base para a construção de bibliotecas.

As bibliotecas de DNA possuem função essencial no mapeamento gênico, clonagem e identificação de novos genes. Existem dois tipos clássicos de biblioteca e cada um deles é usado com diferentes propósitos. A biblioteca genômica consiste em clonar fragmentos de DNA genômico em vetores específicos, de maneira a obter uma representação completa do genoma do organismo a ser estudado. Por outro lado a biblioteca de DNA complementar (cDNA) é uma abordagem interessante quando o objetivo é selecionar apenas os genes que estão sendo expressos em determinado organismo ou condição (CORTNER et al., 1997), como por exemplo os genes que estão sendo expressos na condição de estresse hídrico. Para a construção destas bibliotecas de genes diferencialmente expressos, torna-se necessário uma metodologia de isolamento dos genes. Neste trabalho a técnica desenvolvida foi a hibridização subtrativa supressiva – SSH (DIATCHENKO et al., 1996), a qual provém de uma metodologia direcionada para selecionar unicamente as espécies singulares de cDNA, removendo as sequências

em comum que são expressas (JIANG et al., 2004). Ao final de todo o processo restarão apenas genes expressos na condição em que se deseja, no caso deste estudo, os expressos em resposta ao estresse e hídrico.

Após a identificação e seqüenciamento destes genes, eles podem ser utilizados como sondas moleculares em programas de melhoramento, na identificação de genótipos que expressem mecanismos metabólicos a fim de aumentarem sua tolerância às condições de deficiência hídrica.

O trabalho teve como objetivo avaliar genótipos de feijão e classificá-los em tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico por meio de características morfológicas, construir uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos dos genótipos discriminados, seqüenciar os fragmentos das bibliotecas os quais são provavelmente responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico em feijão no período do florescimento.

2 CAPÍTULO I: *SCREENING* DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO

2.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar genótipos de feijão submetidos ao estresse hídrico por meio de avaliação de características morfológicas. As avaliações foram realizadas em nove genótipos de feijão: IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri, IPR Juriti, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru. Os genótipos foram submetidos a duas condições hídricas: i) irrigação conforme a necessidade hídrica da cultura durante todo o ciclo e ii) irrigação conforme a necessidade hídrica da cultura até o aparecimento do primeiro botão floral, seguida de supressão da irrigação por 15 dias. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com três repetições. As características avaliadas foram: i) Estatura de planta; ii) Diâmetro do caule; iii) Número de legumes por planta; iv) Número de grãos por legume; v) Comprimento da raiz e vi) Massa seca da raiz. O caráter diâmetro do caule não serve para discriminar os genótipos de feijão como tolerantes ou suscetíveis a falta de água. O genótipo Pérola foi superior para a maioria das características avaliadas e desta forma é classificado como tolerante ao estresse hídrico no período do florescimento. Os genótipos IAPAR 81 e IPR Juriti apresentaram os menores valores para a maioria das características avaliadas e desta forma são classificados como suscetíveis ao estresse hídrico no período do florescimento.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Caracteres morfológicos. Estresse Abiótico. Variabilidade genética.

2.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate bean genotypes and classifies them into tolerant and sensitive to water stress through morphological characteristics. Were evaluated nine

bean genotypes: IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri, IPR Juriti, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru. The genotypes were submitted to two water conditions: i) irrigation as the crop water requirements during the whole cycle and ii) irrigation to supply crop water requirements until the emergence of the first bud flower, when the irrigation was suppressed for 15 days. The experiment was conducted in a randomized block design, with three replications. The characteristics evaluated were: i) Plant height; ii) Stem diameter, iii) Pods per plant, iv) Grains per pod; v) Length of the root and vi) Mass of dry roots. The stem diameter should not be used to discriminate bean genotypes as tolerant or susceptible to water stress. The Perola genotype was the higher for most evaluated traits and was classified as tolerant to drought stress during flowering. The IAPAR 81 and IPR Juriti genotypes presented the worst results for most of evaluated traits and were classified as susceptible to water stress during flowering.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Morphologic Characters. Aabiotic Stress. Genetic variability.

2.3 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão representa grande importância a nível mundial e nacional. No Brasil, é cultivado por pequenos, médios e grandes agricultores, com produção anual total de 3,4 milhões de toneladas (CONAB, 2010). Atualmente, apesar da qualidade tecnológica, não se observam ganhos substanciais na produtividade média brasileira de feijão, que é em torno de 842 kg ha⁻¹ (IBGE, 2010). Esse valor pode ser considerado baixo se comparado ao rendimento de 1.800 kg ha⁻¹ ou superior, que pode ser obtido com uso da irrigação tecnicamente conduzida (OLIVEIRA et al., 2005).

Assim as baixas produções têm sido atribuídas a cultivares pouco produtivas, incidência de pragas e doenças, e principalmente devido às diferentes condições edafoclimáticas as quais o feijão é cultivado. A seca está entre os fatores climáticos, a seca é o que mais contribui para o insucesso das culturas (GUIMARÃES et al., 2006; RAMALHO et al., 2009), acarretando em baixo rendimento de grãos (OLIVEIRA et al., 2005). Estima-se que na cultura do feijão na África, cerca de 300 mil toneladas de feijão são perdidos anualmente devido à seca (RAMALHO et al., 2009). O feijão é considerado uma espécie com pouca tolerância ao estresse hídrico, 60% de seu cultivo

em todo o planeta está submetido a este fator, tornando a seca o maior redutor da produtividade (BEEBE et al., 2008; AGUIAR et al., 2009). Além disso, a baixa disponibilidade de água no solo é um fator limitante na produção do feijão, em três estádios críticos, que são a germinação, florescimento e enchimento de grãos (SORATTO et al., 2003).

O modo como as plantas respondem ao estresse é crucial para o rendimento de grãos, sendo que o ambiente desfavorável constitui o fator mais significativo conduzindo a substancial e incalculável diminuição na produtividade (CUSTÓDIO et al., 2009). A maioria das culturas possui períodos críticos, durante os quais a falta de água causa sérios decréscimos em seu rendimento, sendo que estes podem variar de acordo com a duração e severidade do estresse.

Algumas práticas de manejo podem contribuir para o aumento da produtividade em condições de estresse, mas o maior progresso tem sido obtido através do melhoramento (SINGH, 1995), pois as cultivares tolerantes tem a capacidade de interpretar os sinais ambientais e enviá-los à maquinaria celular responsável pela regulação da expressão gênica e que desencadeará uma série de fenômenos, aumentando sua chance de sobrevivência (CUSTÓDIO et al., 2009).

Existem poucos dados fisiológicos sobre o efeito da deficiência hídrica imposta de forma contínua. Porém sabe-se que o estresse hídrico geralmente aumenta a resistência difusiva ao vapor de água, mediante o fechamento dos estômatos, reduzindo a transpiração e, conseqüentemente, o suprimento de CO₂ para a fotossíntese.

Uma das maneiras de remediar a curto prazo o problema que a cultura do feijão enfrenta devido a deficiência hídrica, é a avaliação dos genótipos já utilizados comercialmente em ambiente controlado, para que os tolerantes possam ser utilizados em áreas onde a falta de água é recorrente e afeta o desenvolvimento da cultura. Estes genótipos tolerantes também podem ser utilizados em programas de melhoramento como fonte de estudo para associar essa característica a outras dos demais genótipos que compõem os blocos de cruzamentos, e ainda, bem como para de estudo de expressão gênica.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar genótipos de feijão e classificá-los em tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico por meio de características morfoagronômicas, para posterior utilização no estudo da expressão gênica.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação ao estresse hídrico foram utilizados nove genótipos de feijão registrados no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), sendo cinco do grupo comercial carioca: (IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri e IPR Juriti) e quatro do grupo preto: (IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru).

O experimento foi conduzido durante todo o ciclo em casa de vegetação. A semeadura foi realizada em baldes plásticos com 10 Kg de solo pesado e uniformizado, proveniente da área experimental e classificado como Cambissolo Húmico. Foram semeadas cinco sementes e mantidas no balde até o momento do aparecimento da primeira folha trifoliolada (V3), quando foi realizado o raleio mantendo duas plantas por balde. No momento da semeadura foi realizada a correção do solo de acordo com a análise química, sendo incorporado seis gramas de NPK na formulação 5:20:20 em cada balde. O pH do solo de 5,7 não necessitou de correção. A adubação de cobertura foi realizada com uréia (três gramas por balde) quando as plantas estavam no estágio V3-4. Sempre que necessário foram retiradas as plantas invasoras de forma manual.

Os genótipos foram submetidos a duas condições hídricas. Na condição 1 foram irrigados conforme a necessidade hídrica da cultura durante todo o ciclo. Na condição 2 foram irrigados conforme a necessidade hídrica da cultura até o aparecimento do primeiro botão floral (R6). A partir desse momento, a irrigação foi suspensa por um período de 15 dias. Após esse período a irrigação foi retomada conforme a necessidade hídrica da cultura até a conclusão do ciclo. Metodologia semelhante foi utilizada por diversos autores como Aguiar et al. (2009).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Foram avaliadas ao final do ciclo as características da parte aérea e das raízes: *i*) Estatura de planta (cm); *ii*) Diâmetro do caule (mm); *iii*) Número de legumes por planta; *iv*) Número de grãos por legume; *v*) Comprimento da raiz (cm) e *vi*) massa seca da raiz (g) e massa de cem grãos (g).

Para a avaliação do sistema radicular foi realizado arranquio das plantas iniciando-se com um leve revolvimento do solo com hastes pontiagudas e em seguida retirada das plantas do solo. A seguir, as raízes foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha, para serem realizadas as medições do comprimento do eixo principal com auxílio de trena calibrada em milímetros. Em seguida, as raízes foram

acondicionadas individualmente em sacos de papel e levadas a estufa por 24 horas a temperatura de 48°C para determinação da massa seca. Passado este período realizou-se a pesagem em balança digital com precisão de 0,001g.

O modelo estatístico utilizado neste experimento foi:

$$Y_{ijk} = m + b_i + g_j + n_k + e_{ijk}$$

Fatores experimentais: i) Genótipo (c) e ii) Níveis de água (na).

Efeitos expressos na equação do modelo estatístico: m: média; b_i: efeito do bloco; g_j: efeito do genótipo; n_k: efeito do nível de água e e_{ijk}: erro experimental. O Símbolo (|) indica interação entre os fatores e os efeitos principais.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro e posterior teste de comparação de médias (Scott-Knott), com a finalidade de caracterizá-los como tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico no período do florescimento, através do programa SAS. A divergência genética foi estimada por meio da estatística de Mahalanobis (D²), e o dendrograma foi construído a partir da matriz de dissimilaridade genética, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) (ROHLF, 2000), disponíveis nos programas Genes e NTSys.

2.5 RESULTADOS

A partir dos resultados, pode ser verificado que para todas as características avaliadas, houve efeito significativo da interação genótipo x nível de água (g vs. n), exceto para o diâmetro do caule, o qual não apresentou efeito significativo para nenhuma das fontes de variação testadas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância para os nove genótipos submetidos a duas condições de potencial hídrico do solo, para as variáveis, estatura (EST), diâmetro do caule (DC), número de legumes por planta (NLP), número de grãos por legume (NGL), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR).

F.V.	G.L.	Quadrado Médio					
		EST	DC	NLP	NGL	CR	MSR
Genótipo (G)	8	2149,51*	0,037	6,85*	11,49*	31,82*	0,020*
Nível de água (NA)	1	1940,98*	0,024	10,51*	4,04*	61,88*	0,014*
G x NA	8	835,74*	0,008	1,04*	0,25*	20,45*	0,005*
Bloco	2	198,45	0,005	4,13	0,09	7,65	0,003
Erro	34	261,30	0,003	2,12	0,14	17,33	0,004
CV(%)	-	32,26	18,76	17,78	10,14	24,34	27,80

* Significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste de F.

A decomposição dos graus de liberdade foi efetuada através de contrastes (comparação entre o genótipo submetido ao estresse hídrico vs. genótipo sem estresse), a qual revelou um efeito significativo para todas as variáveis avaliadas. Todos os genótipos apresentaram comportamento diferenciado em relação às condições hídricas do solo as quais foram submetidos. Este procedimento não permitiu a discriminação dos genótipos, o qual foi realizado por meio de teste de comparação de médias para identificar e caracterizar os sensíveis e os tolerantes.

A partir das médias das seis características avaliadas nos nove genótipos de feijão submetidos ao estresse hídrico, pode-se observar que o Pérola apresentou o maior valor para estatura de planta (0,89 m) quando comparado aos demais genótipos estudados. Sua média foi significativamente diferente de todos os genótipos, até mesmo do que apresentou a segunda maior média, o IPR Chopim (0,74 m). Em contrapartida, o genótipo IPR Juriti (0,31 m) apresentou pequeno desenvolvimento da parte aérea apresentando a menor estatura de planta, diferindo significativamente dos demais genótipos (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de médias para os nove genótipos submetidos a estresse hídrico, para as variáveis, estatura de planta (EST) em m, diâmetro do caule (DC) em m, número de legumes por planta (NLP), número de grãos por legume (NGL), comprimento da raiz (CR) em m massa seca da raiz (MSR) em kg.

Genótipo	Característica					
	EST	DC	NLP	NGL	CR	MSR
Pérola	0,89 A	0,0032 A	11,87 A	5,87 A	0,17 B	0,00035 A
IPR Chopim	0,74 B	0,0038 A	10,33 A	4,24 B	0,18 B	0,00031 A
IPR Uirapuru	0,48 C	0,0037 A	8,17 B	4,33 B	0,21 A	0,00029 A
IPR Colibri	0,46 C	0,0026 A	8,17 B	4,19 B	0,14 C	0,00012 C
IPR Tiziu	0,41 D	0,0036 A	6,63 C	4,38 B	0,17 B	0,00027 A
IAPAR 14	0,41 D	0,0033 A	8,30 B	4,13 B	0,16 C	0,00021 B
IPR Gralha	0,38 D	0,0031 A	6,69 C	4,35 B	0,19 B	0,00022 B
IAPAR 81	0,38 D	0,0034 A	6,52 C	4,21 B	0,12 D	0,00017 B
IPR Juriti	0,31 E	0,0035 A	8,25 B	3,92 C	0,18 B	0,00019 B

Médias seguidas pela mesma letra indicam não haver diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Quanto às variáveis número de legumes por planta (NLP) e número de grãos por legume (NGL), observa-se que o genótipo Pérola obteve o melhor desempenho (11,87 e

5,87). O genótipo IPR Chopim apresentou o segundo maior valor para NLP (10,33). Entretanto, os valores de NLP para os dois genótipos citados não diferiram significativamente, porém diferiram de todos os demais. O IPR Tiziu apresentou a segunda maior média para NGL (4,38), diferindo significativamente do genótipo Pérola. Em contrapartida, o genótipo IAPAR 81 teve desempenho insatisfatório apresentando um baixo NLP (6,32) seguido do IPR Gralha e IPR Juriti (6,52 e 6,69), mas eles não diferiram significativamente entre si, no entanto diferiram dos genótipos com maior média. O IPR Juriti apresentou o mesmo comportamento do NLP para a característica NGL (3,92), mostrando a pior média frente aos outros genótipos e essa sendo diferente significativamente.

Para as características radiculares, como o comprimento da raiz e massa seca da raiz, diferentes genótipos apresentaram valores elevados, como IPR Uirapuru para CR (0,21 m) e Pérola para MSR (0,00035 Kg) (Tabela 2) sendo importante ressaltar que o IPR Uirapuru teve uma diferença significativa em relação aos demais genótipos para CR. O Pérola não diferiu estatisticamente dos genótipos IPR Chopim, IPR Uirapuru e IPR Tiziu para MSR, os quais apresentaram valores elevados para a esta característica. Em contrapartida, o genótipo IAPAR 81 apresentou o menor desempenho para ambas as características (0,12 m para CR e 0,00017 Kg para MSR), diferindo significativamente de todos os genótipos para estas características.

Analisando o dendrograma da Figura 1, construído com os dados fenotípicos dos genótipos em condições de estresse hídrico, verifica-se a formação de tres grupos: *i*) IPR Juriti e IAPAR 81 e *ii*) IAPAR 14, IPR Tiziu, IPR Gralha, IPR Colibri, IPR Uirapuru e IPR Chopim, e *iii*) Pérola.

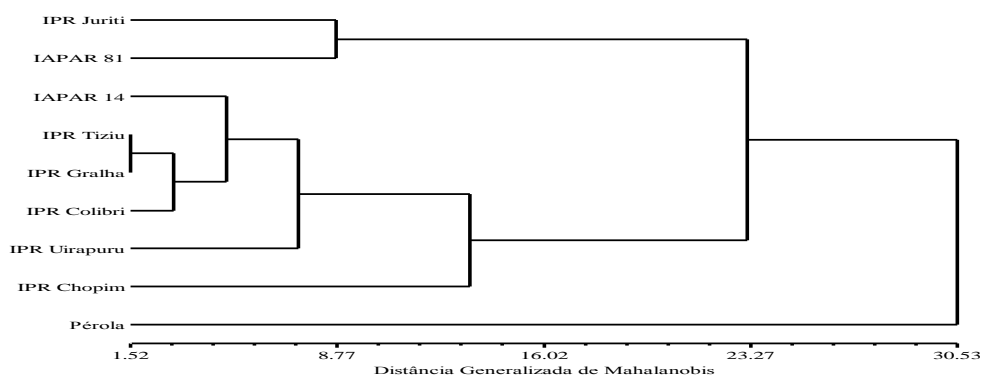


Figura 1. Dendrograma referente aos nove genótipos de feijão comum que foram submetidos ao estresse hídrico, utilizando o índice de dissimilaridade de Mahalanobis (D^2) por meio do método de agrupamento UPGMA.

Acredita-se que a superioridade apresentada para a maioria dos caracteres avaliados em condições de estresse hídrico para o genótipo Pérola, lhe rendeu destaque em relação aos demais genótipos, evidenciando sua dissimilaridade observada no dendrograma. Da mesma forma, o desempenho inferior do IPR Juriti e IAPAR 81 evidenciado pelos baixos valores dos caracteres avaliados conferiram a eles sua junção no primeiro grupo bem como, grande dissimilaridade com o genótipo Pérola o qual apresentou grande distancia.

Em condições ideais de irrigação, a disparidade entre os genótipos estudados parece resultar da divergência genética entre eles, desta forma, verifica-se no segundo dendrograma (Figura 2) a formação de um grande grupo onde estão os genótipos: *i*) IAPAR 81, IPR Juriti, Pérola, IPR Uirapuru, IPR Tiziu e IPR Galha, um segundo grupo com apenas dois genótipos: *ii*) IPR Chopim e IAPAR 14, e um genótipo isolado: *iii*) IPR Colibri.

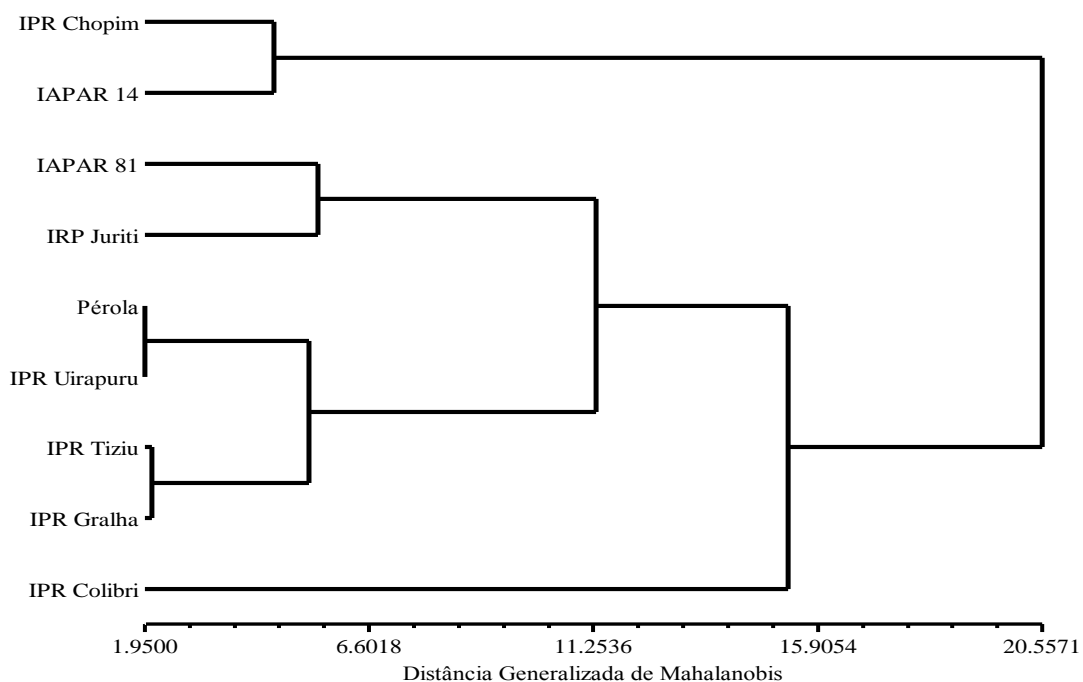


Figura 2. Dendrograma referente aos nove genótipos de feijão comum que foram não submetidos ao estresse hídrico, utilizando o índice de dissimilaridade de Mahalanobis (D^2) por meio do método de agrupamento UPGMA.

2.6 DISCUSSÃO

O caráter diâmetro de caule (DC) é de grande importância para a arquitetura da planta, visto que caules grossos e rígidos evitam o seu acamamento. Entretanto, não houve diferenças significativas para nenhuma das fontes de variação (Tabela 1). Em função disso, esta não é uma variável eficiente para discriminação de genótipos de feijão, quando estes são submetidos à deficiência hídrica. As demais características avaliadas apresentaram diferença significativa para os efeitos de nível de água, genótipo e interação $g \times n$ resultando em diferenças entre os genótipos avaliados proporcionando subsídios para *screening* dos mesmos.

A aplicação do teste F para fatores com mais de um grau de liberdade, permite obter informações gerais, relacionadas com o comportamento médio dos tratamentos (BANZATTO e KRONKA, 2006). No entanto, os desdobramentos ortogonais dos graus de liberdade de tratamentos permitem obter informações mais específicas, relacionadas com o comportamento médio de cada um dos componentes do desdobramento (NESI e GARCIA, 2005).

Desta forma os contrastes efetuados a fim de desdobrar os graus de liberdade da interação demonstraram que todos os genótipos foram diferentes de suas testemunhas e estes resultados corroboram com o esperado, pois, quando o genótipo é submetido a uma condição de estresse o valor de suas características apresenta um decréscimo, mesmo para genótipos tolerantes. Molina et al. (2001) observaram que a supressão hídrica, ocorrida durante as fases de florescimento, ocasiona redução para a maioria das características agronômicas do feijão.

Os resultados encontrados na literatura para o comportamento do caráter estatura de plantas são divergentes. Em alguns casos, os genótipos apresentaram redução da estatura da planta pelo fato do estresse hídrico reduzir o turgor das células e, conseqüentemente, o seu crescimento (COSTA et al., 2008); mas em outros, observou-se um aumento quando os genótipos foram submetidos ao estresse hídrico (AGUIAR et al., 2009). Ainda, segundo os mesmos autores, tal resultado pode ser conseqüência do estiolamento das plantas quando submetidas a essas condições, sendo que, os genótipos que apresentaram redução da característica não possuem atributos de tolerância ao estresse hídrico, desta forma, EST é uma característica apropriada a ser utilizada na distinção de genótipos contrastantes e assim auxiliar na identificação dos tolerantes.

Desta forma verifica-se que o genótipo Pérola, o qual apresentou o maior valor para a característica, opôs-se ao IPR Juriti que apresentou o pior desenvolvimento (Tabela 2), demonstrando assim que o Pérola está indicando ser um genótipo tolerante a seca.

Considerando que o rendimento de grãos é a característica mais importante do ponto de vista agrícola e econômico em culturas como o feijão, as avaliações de desempenho de genótipos tolerantes à seca, são efetuadas mensurando-se as características a ele relacionadas (ACOSTA-GALLEGOS e ADAMS, 1991), no caso os componentes do rendimento.

Desta forma, genótipos que em condições de baixa disponibilidade de água no solo apresentarem reduzido NLP e NGL são genótipos que não possuem a capacidade de tolerar o déficit hídrico, como foi observado para o IAPAR 81 e IPR Juriti que apresentaram valores muito baixos para ambas características (Tabela 2). Por outro lado, genótipos que se sobressaem para NLP e NGL, os quais representam os principais componentes do rendimento, são os que certamente possuem habilidade de tolerar períodos de estresse hídrico como é o caso do Pérola. Deste modo, se uma planta mantém o status desejável para NLP e NGL, certamente o rendimento será satisfatório, ainda que esteja sob estresse hídrico. Tal fato pode propiciar segurança no cultivo de feijão em áreas onde a probabilidade de ocorrência de estresse hídrico é grande e assim minimizar perdas na produção final como ocorre quando é feita a utilização de cultivares sensíveis à falta de água (VIBRANS e SCHRAMM, 2010).

As variáveis EST junto com NLP e NGL são de extrema importância para o melhoramento vegetal, visto que genótipos que apresentaram superioridade na EST em condições de estresse hídrico são genótipos potenciais a tolerar a falta de água. Os genótipos com maior desenvolvimento desta variável provavelmente possuem maior capacidade de recuperação após o estresse e assim melhores condições de competição por luz em especial com gramíneas invasoras que na grande maioria são plantas C₄ e sofrem menos a falta de água. As variáveis NLP e NGL também estão correlacionadas de forma positiva com o rendimento de grãos, sendo que, quanto maiores os seus valores, maior será a produção. De acordo com os resultados da Tabela 2, comprova-se que os genótipos Pérola e IPR Chopim são promissores quanto a tolerância ao estresse hídrico pois sobressaíram-se de forma significativa dos demais genótipos, para EST, NLP e NGL.

Considerando todos os órgãos da planta, as raízes são as menos estudadas, entendidas e apreciadas, pelo fato de não poderem ser vistas e, ainda, pela dificuldade

que seu estudo oferece (HUGHES et al., 1992). Por esse motivo não são avaliadas em larga escala em programas de melhoramento. Contudo, são elas que, além de servirem como suportes para a planta, absorvem e translocam água e nutrientes, armazenam carboidratos (SOUSA et al., 2009), além de servirem como indicadores de genótipos tolerantes ao estresse hídrico.

A característica de tolerância à seca está diretamente relacionada ao comprimento e densidade da raiz (ARUNYANARK et al., 2009). Genótipos que apresentam comportamento superior para tais características devem ser inclusos em blocos de cruzamentos de programas de melhoramento que visem desenvolver genótipos capazes de tolerar longos períodos de estiagem. As plantas com esses genótipos possuem genes relacionados a capacidade de expansão radicular evitando assim maiores prejuízos a cultura do feijão. Tal comportamento foi verificado nos genótipos IPR Uirapuru e Pérola que apresentaram elevados valores para CR e MSR. Em contrapartida, o desempenho insatisfatório do IAPAR 81 para CR e MSR (Tabela 2) se deve a baixa capacidade de expansão radicular em busca de água nos perfis mais profundos do solo. Barbosa et al. (2000) observaram uma redução no comprimento radicular em espécies de Lenho em condições de estresse hídrico, e esta não é uma característica desejável.

O déficit de umidade ocorrido no florescimento provocou reduções na produção de grãos na cultura do feijão, sendo que, este foi mensurado a partir do NLP e NGL. Quanto menor a redução dessas variáveis em condições de estresse, maior o potencial de rendimento das cultivares, podendo estas serem referidas como tolerantes ao estresse hídrico (GARRIDO, 1998), como por exemplo, os genótipos Pérola e IPR Chopim.

Resultados obtidos por Aguiar et al. (2009) mostram que a supressão hídrica, ocorrida durante as fases de florescimento ocasionaram redução na maioria das características avaliadas, evidenciando a suscetibilidade de genótipos de feijão ao estresse hídrico, neste estágio de desenvolvimento. Sendo que, os genótipos que não sofreram grandes reduções das características estudadas nessas condições, devem ser classificados com tolerantes ao estresse hídrico. É possível verificar que os genótipos IAPAR 81 e Pérola são contrastantes quanto aos efeitos ocasionados pela falta de água, já que eles apresentaram os piores e os melhores desempenhos para a maioria das características avaliadas.

Independente da magnitude do estresse hídrico, genótipos de feijão respondem de maneira diferenciada ao déficit de água no solo durante o período da floração

(MOLINA et al., 2001). E por este fato os genótipos puderam ser caracterizados como tolerantes ou sensíveis a falta de água.

A caracterização morfológica e o agrupamento de genótipos utilizando recursos de análise multivariada têm contribuído efetivamente para o melhoramento genético de várias culturas (SANTOS et al., 2000), possibilitando identificar se há dissimilaridade ou não entre os genótipos. A capacidade de tolerar o estresse hídrico devido a superioridade que apresentou para as características avaliadas proporcionou ao Pérola grande dissimilaridade do IAPAR 81 e do IPR Juriti (Figura 1). Tal dissimilaridade entre estes genótipos não foi observada na Figura 2, evidenciando que em condições ideais de desenvolvimento, suas composições gênicas não proporcionam diferença entre eles, visto que, situaram-se no mesmo grupo. O agrupamento em chaves distintas do Pérola com os genótipos IAPAR 81 e IPR Juriti é devido a expressão gênica diferencial do Pérola em condições de estresse hídrico que lhe proporcionou superioridade.

2.7 CONCLUSÃO

O caráter diâmetro do caule não deve ser utilizado para discriminar os genótipos de feijão em tolerantes e sensíveis a falta de água.

O genótipo Pérola mostrou-se superior para a maioria das características avaliadas sendo classificado como tolerante ao estresse hídrico no período do florescimento.

Os genótipos IAPAR 81 e IPR Juriti apresentaram resultados inferiores para a maioria das características avaliadas sendo classificados como sensíveis ao estresse hídrico no período do florescimento.

3 CAPÍTULO II: BIBLIOTECA DE GENES QUE CONDICIONAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO

3.1 RESUMO

O presente estudo teve por objetivo, submeter genótipos de feijão a condição de estresse hídrico durante o período do florescimento, construir uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos a partir dos genótipos discriminados, e revelar a constituição dos genes responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico em feijão. Foram utilizados os genótipos Pérola e IAPAR 81, classificados como tolerante e sensível ao estresse hídrico. Inicialmente foi extraído o RNA das folhas dos dois genótipos na condição de estresse e na condição normal de irrigação. Em seguida, iniciou-se a hibridização subtrativa supressiva (SSH). Os fragmentos diferencialmente expressos obtidos foram clonados no vetor pGEM e transformados utilizando a bactéria E.Coli. Após o isolamento e crescimento das colônias, essas foram purificadas, e os clones foram seqüenciados utilizando o Kit Big Dye. As seqüências obtidas foram alinhadas, corrigidas e comparadas a outras seqüências depositadas no Genbank. O genótipo Pérola apresentou expressão diferencial de genes que lhe conferem a tolerância ao estresse hídrico. O genótipo IAPAR 81 também expressa genes em condição de estresse, no entanto, estes não lhe conferem tolerância. A SSH foi eficiente no isolamento de fragmentos de genes diferencialmente expressos os quais possibilitaram a construção de duas bibliotecas. O seqüenciamento de clones permitiu encontrar seqüências diferencialmente expressas no genótipo Pérola não descritas no banco de dados.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Estresse hídrico. Hibridização subtrativa supressiva. Expressão diferencial de genes.

3.2 ABSTRACT

This study aimed to subject bean genotypes to the condition of water stress during flowering. Moreover, build a library of differentially expressed cDNAs from genotypes discriminated, and reveal the constitution of the genes responsible for tolerance to water stress in beans. We used the Pérola and IAPAR 81 genotypes, which are classified as tolerant and sensitive to water stress. Initially, RNA was extracted from leaves of two genotypes on condition of stress, and in the normal irrigation. Then, we began the suppressive subtractive hybridization (SSH). The differentially expressed fragments obtained were cloned into pGEM vector and transformed using the bacterium *E. coli*. After isolation and growth of the colonies, these were purified, and the clones were sequenced using the Big Dye Kit. The sequences were aligned, adjusted and compared to other sequences deposited in Genbank. The Pérola genotype presented differential expression of genes that confer tolerance to drought stress. The IAPAR 81 genotype also expresses genes under conditions of stress, however, these do not confer tolerance to the plant. The SSH technique was effective in isolating differentially expressed gene fragments which allowed the construction of two libraries. The sequencing of clones allowed us to find differentially expressed sequences in the genotype Pérola not described in the database.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Water stress. Suppressive subtractive hybridization. Differential gene expression.

3.3 INTRODUÇÃO

O feijão faz parte da alimentação diária de milhões de pessoas no mundo, possui grande valor nutricional (JÚNIOR et al., 2011), é cultivado em todo o território nacional (IBGE, 2010), porém a maioria dos locais de produção enfrentam déficit hídrico durante o período de cultivo.

O estresse hídrico é um dos principais fatores ambientais que influencia o crescimento das plantas e limitam a produtividade de grãos em áreas de cultivo (RABELLO et al., 2006). Esse estresse têm sido investigado em diferentes culturas,

como arroz (RABBANI et al., 2003), milho (ZHUANG et al., 2007) e feijão (MICHELETTO et al., 2007).

O melhoramento genético vegetal, é uma ferramenta fundamental para a obtenção de plantas mais tolerantes e mais produtivas em condições restritivas, uma vez que os estresses abióticos podem reduzir significativamente o rendimento das lavouras (RABELLO et al., 2006). A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são cruciais para o desenvolvimento de cultivares de feijão tolerantes ao déficit hídrico. As plantas sob estas condições desenvolvem modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares como resposta de proteção, porém as modificações bioquímicas e moleculares resultam numa complexa rede de sinalização celular que envolve a indução e repressão de vários genes (PRICE et al., 2002).

A tolerância ao estresse hídrico é uma característica poligênica, fato que torna difícil de ser trabalhada no melhoramento genético clássico. Por isso, poucos programas de melhoramento se preocupam com essa característica (BEEVER, 2000) e conseqüentemente, poucos cultivares tolerantes à seca têm sido desenvolvidos. Dessa maneira, a biologia molecular vem assumindo um papel essencial na identificação dos genes envolvidos nas respostas das plantas ao déficit hídrico. Os genes identificados podem ser utilizados como sondas moleculares em programas de melhoramento que busquem a identificação de genótipos portadores de genes de interesse capaz de expressar mecanismos metabólicos que conferem tolerância em condições de deficiência hídrica (CASAGRANDE et al., 2001).

Neste contexto, a técnica da hibridização subtrativa supressiva (SSH) desenvolvida por Diatchenko et al. (1996) assume grande importância, pois permite a criação de bibliotecas de cDNA enriquecidas de transcritos diferencialmente expressos, presentes em apenas uma das amostras comparadas, ou seja, identifica genes induzidos em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos (GUZZO, 2004). Essas bibliotecas têm função essencial no mapeamento gênico, na clonagem e na identificação de genes. Esta técnica é eficaz em selecionar apenas os genes que estão sendo expressos num determinado organismo ou condição específica (CORTNER e WOUDE, 1997).

A SSH é uma metodologia que seleciona unicamente as espécies singulares de cDNA, removendo as seqüências expressas em comum (JIANG et al., 2004) quando duas populações de cDNA são confrontadas. A técnica envolve a hibridização de uma fita de cDNA gerada a partir de um mRNA teste, com um mRNA controle. Em etapas

subseqüentes é possível obter moléculas de cDNA de dupla-fita, os quais são clonados em vetores específicos (WHITFIELD et al., 2002). Posteriormente efetua-se o seqüenciamento das regiões clonadas que correspondem a seqüência nucleotídica dos genes responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico e, finalmente a síntese de iniciadores para efetuar a seleção assistida por marcadores moleculares.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo submeter genótipos de feijão a condição de estresse hídrico, construir uma biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos a partir dos genótipos discriminados como tolerante e sensível, e descobrir a constituição dos genes responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico em feijão, no período do florescimento.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Caracterização dos genótipos

Os genótipos de feijão utilizados para dois tratamentos foram: IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri, IPR Juriti, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru. Ao final do ciclo foram coletadas folhas de todos os genótipos as quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (-80 °C). Após a classificação dos genótipos em tolerante e sensível ao estresse hídrico, as folhas dos demais genótipos foram descartadas.

3.4.2 Extração de RNA

Após a identificação dos genótipos tolerante e sensível, procedeu-se a extração de RNA dos folíolos. Foram quatro amostras, o genótipo Pérola na condição ideal de irrigação (controle) e na condição de estresse (teste), e o genótipo IAPAR 81 na condição ideal (controle) de irrigação e na condição de estresse (teste). Para a extração do RNA total utilizou-se o reagente comercial Trizol (Invitrogen, USA, Cat.Nº. 15596026), conforme instruções do fabricante. Após a extração o pellet obtido foi ressuspendido em 20 µl de água ultra-pura, e a qualidade foi verificada quantitativamente em gel de agarose 1,5 % (m/v) e em espectrofotômetro (Eppendorf). Os utensílios utilizados na extração foram previamente tratados com solução de NaOH 0,5 N e autoclavados por 20 minutos a uma temperatura de 120 °C.

3.4.3 Construção da biblioteca de cDNA diferencialmente expresso

Para a hibridização subtrativa supressiva (DIATCHENKO et al., 1996; GURSKAYA et al., 1996), utilizou-se o kit PCR Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) seguindo o protocolo PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual (Cat. No. 637401). Os genótipos utilizados nesse procedimento foram: Pérola na condição de estresse (teste) e na condição normal de irrigação (controle), e IAPAR 81 na condição de estresse (teste) e na condição normal de irrigação (controle).

3.4.3.1 Síntese de cDNA fita simples e fita dupla

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada combinando dois microgramas (de 2 a 4 µL) do RNA total, iniciador cDNA Synthesis Primer (5'-TTTTGTACAAGCTT₃₀N₁N-3'), dNTPs e a enzima AMV Reverse Transcriptase. Esta enzima trata-se de uma polimerase de origem viral a qual adiciona os nucleotídeos complementares a uma fita de RNA molde sintetizando uma primeira fita de cDNA.

A primeira fita de cDNA serve como molde para a síntese da segunda fita. Para tanto, ao cDNA de fita simples são adicionados dNTPs e a enzima Second-Strand Enzyme Cocktail (20X), que será responsável pela construção da segunda fita. Após a síntese da dupla fita e precipitação do cDNA, foi obtido um pellet o qual foi mantido a temperatura ambiente para secar e posteriormente ressuspensionado em 50 µL de água ultra-pura. A qualidade do cDNA foi avaliada aplicando 5,0 µL do produto em gel de agarose 1,5%.

3.4.3.2 Digestão com *Rsa*I

O cDNA de fita dupla foi digerido com a enzima *Rsa* I que promove cortes que deixam pontas cegas (5' GT|AC 3'), as quais são necessárias para a ligação dos adaptadores no passo seguinte. Após a digestão o material obtido foi purificado dos demais componentes e o precipitado obtido foi ressuspensionado em 5,5 µL de H₂O ultra-pura após estar seco em temperatura ambiente.

A eficiência da digestão foi verificada retirando uma alíquota do cDNA antes da digestão e uma alíquota do cDNA digerido. As duas alíquotas foram aplicadas em gel de agarose 1,5%. Após comprovada a eficiência da digestão, o cDNA controle foi armazenado a -20⁰C, pois não será ligado com os adaptadores, ele será utilizado apenas na hibridizações. Já o cDNA Teste foi utilizado para na próxima etapa.

3.4.3.3 Ligação dos adaptadores no cDNA teste

O cDNA teste digerido foi separado em dois tubos. No tubo1 foi adicionado ao

cDNA teste uma alíquota do adaptador 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAG GGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3'), e no tubo 2, uma alíquota do adaptador 2R (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'). Aos dois tubos foi adicionado a enzima *T4 DNA Ligase*, a qual catalisa uma reação de ligação entre a extremidade 5' das moléculas de cDNA digeridas com a extremidade 3' dos adaptadores. Após um período de incubação para ocorrer a ligação, aos tubos foi adicionado EDTA/Glicogênio para finalizar a ligação, fazendo com que as moléculas estejam prontas para a hibridização.

3.4.3.4 Primeira e segunda hibridização

A primeira hibridização ocorreu entre as amostras de cDNA controle e teste. Desta forma procedeu-se uma reação contendo cDNA teste e cDNA controle, a qual foi inicialmente desnaturada a 98 °C por 90 segundos e em seguida encubada a 68 °C por 8 horas, para o pareamento entre moléculas homólogas. Ao final da primeira hibridização ocorre a separação das moléculas de cDNA diferencialmente expressas na condição de estresse hídrico. O resultado da primeira hibridização é a formação de cinco tipos de moléculas de cDNA (*a*, *b*, *c*, *d* e *e* -Figura 3).

As moléculas *b* e *b'* correspondem a mensagens pouco abundantes que ficam equalizadas e somente são expressas em condição de estresse; moléculas *c* e *c'* correspondem ao reparamento das fitas originais; *d* e *d'* são moléculas teste e controle homologas que foram expressas nas duas condições; *e* e *e'* moléculas controle homologas e *f* e *f'* moléculas controle pouco abundantes (Figura 3).

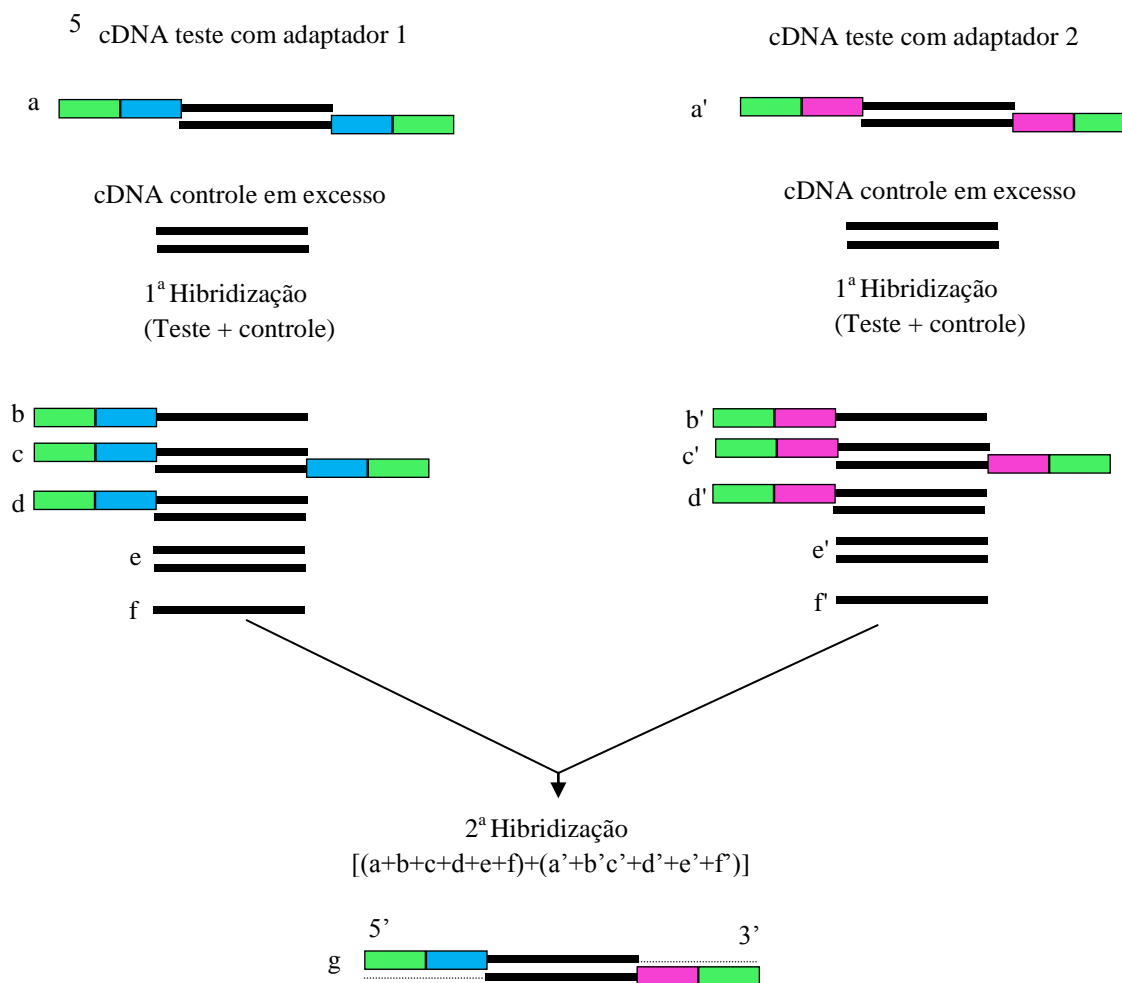


Figura 3. Hibridação subtrativa, tipos de moléculas: (a e a') cDNA teste com adaptador 1; (b e b') moléculas pouco abundantes que só se expressam em condição de estresse; (c e c') reparamento das fitas originais; (d e d') moléculas teste e controle homologas, que se expressam nas duas condições e (e e e') moléculas controle homologas; (f e f') moléculas controle pouco abundantes e (g) cDNA teste hibridizado com os dois adaptadores.

Imediatamente após a primeira hibridização inicia-se a segunda, a qual tem como objetivo a formação de moléculas moldes para a amplificação via PCR. Agora, ocorre a junção dos fragmentos oriundos da primeira hibridização, para que fragmentos homólogos possam parear formando moléculas do tipo g (Figura 3), que possuem os dois adaptadores em suas extremidades. Estas moléculas correspondem aos genes diferencialmente expressos nos genótipos submetidos ao estresse.

3.4.3.5 PCRs primários e secundários

Após as hibridizações, o material foi submetido a uma primeira reação de PCR. No primeiro ciclo da PCR a *DNA polimerase* fez o preenchimento das extremidades

complementar dos adaptadores, para que este sirva como sítio de anelamento do primer 1 e assim as seqüências de interesse possam ser amplificadas exponencialmente. Neste PCR foi utilizado apenas o *primer 1* (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), o qual possui sítio de anelamento com os adaptadores 1 e 2R, juntamente com o mix (*Platinum Taq High Fidelity*, tampão, dNTPs e água), o ciclo desta PCR foram 1 ciclo 72^oC (5'') e 94^oC (25'') e 27 ciclos 94^oC (10''), 66^oC (30'') e 72^oC (90'').

Durante a PCR as diferentes moléculas (Figura 4) apresentam ampliações diferentes. Moléculas do tipo *a* e *a'* não são amplificadas, pois não possuem sítio de anelamento do *primer 1* na extremidade 3'. Moléculas *b* e *b'* não são amplificadas pois existe grande chance de pareamento estável, formam uma estrutura em forma de alça. As moléculas do tipo *c* e *c'* são amplificadas linearmente, pois apenas as extremidade 3' possui sítio de anelamento. Moléculas *d* não são amplificadas pois não possuem ligação com os adaptadores. Por fim, moléculas do tipo *e* serão amplificadas exponencialmente, pois as duas extremidades 3' possuem sítio para o anelamento do *primer 1*. Uma alíquota da reação foi analisada em gel de agarose 2%.

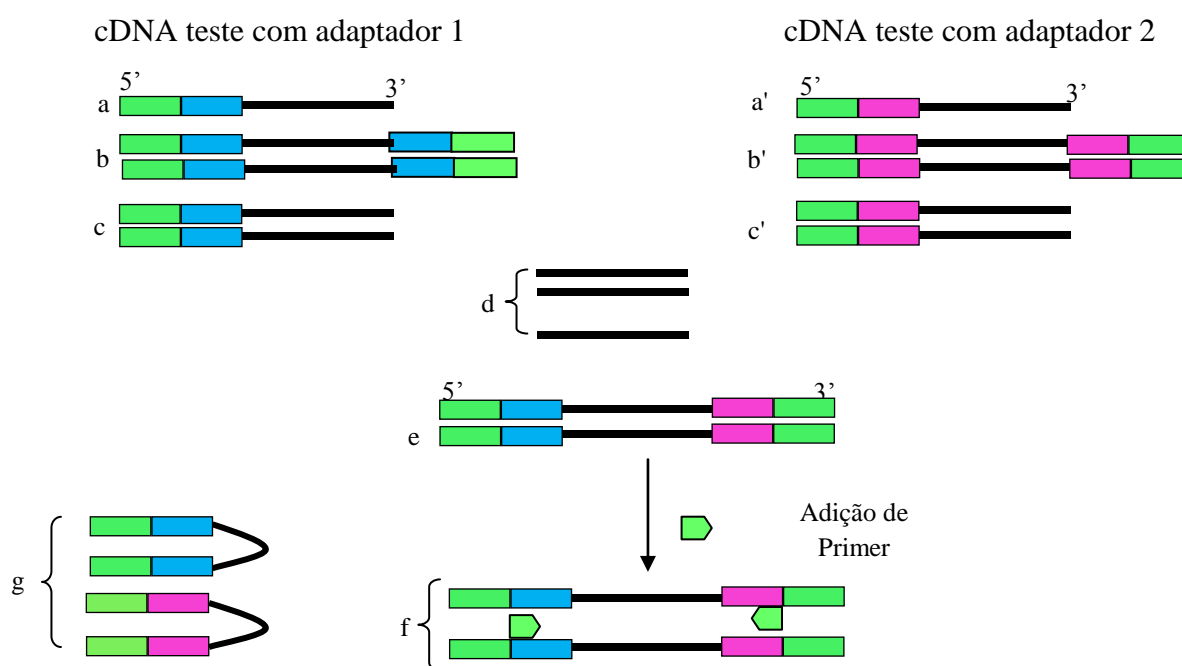


Figura 4. Esquema representando as seqüências resultantes da Reação de PCR, formação de diferentes tipos de moléculas: (a e a') moléculas não hibridizadas com adaptador em uma das pontas; (b e b') moléculas hibridizadas com adaptador nas duas pontas; (c e c') moléculas hibridizadas com adaptador nas duas pontas; (d) moléculas hibridizadas e não hibridizadas sem adaptador; (e) moléculas hibridizadas com adaptador diferentes em cada ponta; (f) moléculas que possuem ligação para os dois primers e (g) moléculas do tipo em forma estável.

O produto do primeiro PCR serviu como base para o *Nested PCR*, que tem por objetivo eliminar restos de adaptadores e enriquecer ainda mais as seqüências de interesse. Os iniciadores utilizados foram o *Nested PCR primer 1* (5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'), que possui sitio de anelamento com o adaptador 1 e o *Nested PCR primer 2R* (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'), que possui sitio de anelamento com o adaptador 2R. Os ciclos de amplificação foram: 12 ciclos 94⁰C (10''), 68⁰C (30'') e 72⁰C (1,5').

Ao final da segunda reação de PCR, as seqüências diferencialmente expressas (seqüências de interesse) estão presentes em abundância e prontas para a clonagem.

3.4.4 Clonagem

3.4.4.1 Preparação dos insertos para clonagem

Para a realização da clonagem, é necessário que o fragmento a ser inserido no plasmídeo apresente uma cauda de adeninas (A), a qual é adicionada pela Taq DNA polimerase. Para isto, 5 µL do produto do *Nested PCR*, foi encubado a 72⁰C por 10 minutos, em uma reação contendo: 1 µL de tampão 10X da Taq, 1 µL da *Taq platinum DNA polimerase* e 3 µL de H₂O ultra pura.

3.4.4.2 Implante do DNA no plasmídeo

A clonagem foi realizada utilizando o Kit pGEM[®]-T Easy Vector (Cat. No. A3600, Promega), conforme instruções do fabricante, o Kit contém o plasmídeo linearizado com extremidades T (Timina). A reação de recombinação procedeu-se em um recipiente contendo gelo, 4 µL de DNA foram misturados ao sal e o Plasmídeo pGEM, a mistura foi homogeneizada e encubada a temperatura ambiente por cinco minutos

Transcorrido este período os plasmídeos recombinantes (50 a 100 ng) foram transformados em 200 µL da bactéria *Escherichia coli* linhagem pMOS *Blue*, utilizando choque térmico (40 segundos a 42⁰C e 40 segundos em gelo). Após o fechamento o meio Luria-Bertani (LB) líquido pH 7,0 foi adicionado e mantido a 37⁰C por 1 h sobre agitação para multiplicação inicial das bactérias.

Decorridos este período as bactérias foram semeados em placa de Pétri contendo meio de cultura LB ágar, suplementado com 50 mg mL⁻¹ de ampicilina, 15 µg mL⁻¹ de tetraciclina, IPTG e X-gal (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). As placas foram incubadas 37⁰C por 18h, após esse período as colônias brancas que correspondem a

colônias de bactérias que possuem o plasmídeos com o inserto de cDNA, foram transferidas uma a uma com auxílio de uma haste, para tubos contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido, enriquecido com 50 mg mL⁻¹ de ampicilina, os tubos foram mantidos a 37 °C por 24 horas sob agitação.

Transcorrido esse período procedeu-se a precipitação das células bacterianas centrifugando os tubos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para a extração do DNA plasmidial.

3.4.4.3 Extração de DNA plasmidial: método da lise alcalina

A extração de DNA plasmidial foi efetuada utilizando o método de lise alcalina com SDS (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Ao precipitado adicionou-se a solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 50 mM de Glucose), a mistura foi agitada até a completa solubilização das células, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente a solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) foi adicionada após a homogeneização os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos. Decorrido este período, a solução III (5 M de acetato de potássio, 2 M de ácido acético e água mQ destilada) foi adicionada homogeneizada e os tubos ficaram no gelo por 5 minutos e procedeu-se a centrifugação. O sobrenadante (500 µl) foi transferido para um tubo e adicionado fenol/clorofórmio (1:1). Após homogeneização procedeu-se a centrifugação das amostras, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e procedeu-se uma extração com 1 volume de clorofórmio. Após nova centrifugação a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado por meio da adição de etanol absoluto. As amostras foram misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 min e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado por duas vezes, com etanol 70%, seco e ressuspendido em 30 mL de TE contendo RNase (1 mg mL⁻¹). As amostras foram mantidas a 37 °C por 1 hora e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) a fim de verificar a qualidade do DNA e estimar a concentração por meio da comparação com amostras de DNA de concentração previamente conhecidas.

3.4.5 Seqüenciamento

3.4.5.1 Reação de seqüenciamento

Dois microlitros de DNA recombinante foram utilizados para a reação de seqüenciamento, a qual utilizou o Kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing

(Applied Biosystems), que contém nucleotídeos (dNTPs) e dideoxynucleotídeos (ddNTP) marcados com fluorescência (fluoraceína e rodamina), e o oligonucleotídeo universal M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). A reação foi finalizada em termociclador utilizando o seguinte programa: 30 ciclos de 96⁰C (2'), 96⁰C (30''), 52⁰C (30'') e 60⁰C (4'). Nesta etapa a DNA polimerase incorpora os dideoxynucleotídeos, os quais interrompem a polimerização. Ao final do programa de termociclagem, a reação está pronta para ser purificada.

3.4.5.2 Purificação da reação de seqüenciamento

Consiste em separar os fragmentos de interesse do restante dos componentes da reação, como por exemplo os primers. As amostras foram precipitadas com isopropanol (65%) lavadas com etanol 70% e ressuspensas em 15µl de formamida. O seqüenciamento se deu em analisador genético ABI 3130 Genetic Analyzer Systems (Applied Biosystems). No analisador, os fragmentos de DNA migram pelo polímero para que ocorra a separação dos fragmentos por tamanho. Quando eles chegam à janela de leitura, um laser excita a fluoraceína (idêntica para as 4 bases nitrogenadas) que excita a rodamina (diferente para cada base). Os cromóforos emitem sinais em forma de cromatograma, onde os picos produzidos representam as bases nitrogenadas identificadas através de diferentes cores (eletroferograma), as quais são traduzidas em seqüências lineares representadas por suas bases.

3.4.5.3 Correção e alinhamento das seqüências

Os eletroferogramas obtidos (Apêndice 1), foram analisados nos programas computacionais de acesso livre Chromas Version 2.33 e BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0. As seqüências do vetor foram retiradas manualmente da seqüência de interesse, e a correção e alinhamento foi feito com o Clustal W do programa BioEdit Alignment Editor e foram comparadas no Genbank através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Caracterização dos genótipos

O estresse hídrico quando ocorre durante a fase de florescimento, ocasiona redução na maioria das características agrônômicas do feijão (MOLINA et al., 2001),

porém, existem genótipos que mesmo sob condição de estresse, apresentam bom desenvolvimento das características como, estatura de planta, comprimento da raiz, número de legumes por planta e número de grãos por legume, e podem ser considerados como tolerantes ao estresse hídrico (GARRIDO, 1998; BARBOSA et al., 2000; ARUNYANARK et al., 2009. Em contrapartida, genótipos que apresentam baixo desempenho devem ser considerados como sensíveis.

O genótipo Pérola, por apresentar superioridade em tolerar o estresse hídrico, quando comparado aos demais genótipos estudados, foi classificado como tolerante, ao contrário o genótipo IAPAR 81 que devido ao desempenho insatisfatório apresentado, foi classificado como sensível ao estresse hídrico. A superioridade do genótipo Pérola se deve a presença de genes, que são responsáveis pela manifestação da tolerância, os quais são ativados em resposta ao estresse hídrico e expressam mecanismos fisiológicos que permitem aos genótipos tolerantes apresentarem bom desempenho para a maioria das características, diferentemente do que aconteceu com o genótipo IAPAR 81, o qual demonstrou não possuir tais genes de tolerância. Desta forma, o estudo da expressão gênica diferencial é uma maneira eficaz de descobrir tais genes que conferem esta tolerância.

3.5.2 Extração de RNA

Após a extração do RNA total, sua quantidade e integridade, foram avaliadas em espectrofotômetro. Verifica-se que o produto da extração dos genótipos Pérola e IAPAR 81 apresentaram uma variação de $2.933,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10.463,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNA, e a relação de integridade A260/280 uma variação de 1,40 a 1,86.

Verifica-se que as extrações realizadas foram eficientes, pois bons rendimentos de RNA total foram obtidos, visto que, uma das maneiras de verificar esta eficiência é avaliar a quantidade em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um rendimento mínimo de RNA total a ser obtido deve ser em torno de $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (ASIF et al., 2006). A relação A260/280 também permite verificar a eficiência da extração, onde, valores próximos a 1,90 são consideradas livres de contaminação de proteínas. Extrações realizadas com o reagente Trizol por Campos et al. (2010), apresentaram valores da relação 260/280 semelhantes aos obtidos neste experimento, os quais asseguraram a integridade do material genético extraído, demonstrando confiabilidade para utilização nas demais etapas dos estudos de expressão gênica.

A integridade do RNA também pode ser verificada em gel de agarose, através da nitidez e distinção das bandas observadas no gel, as quais correspondem as porções ribossômicas 28S e 18S (Figura 5). Tal integridade foi relatada por Gasic et al. (2004) como forma de certificar a qualidade do material genético extraído, assegurando sua possibilidade de utilização nos estudo de hibridação subtrativa supressiva.

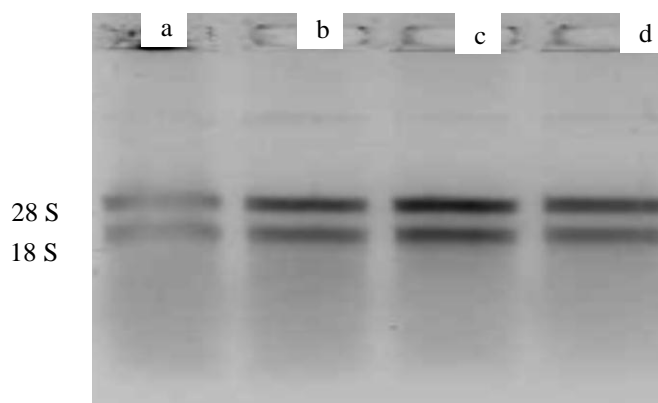


Figura 5. Perfil eletroforético de RNA total, extraído com Trizol, das amostras de feijão. a. Genótipo pérola na condição normal de irrigação; b. Genótipo pérola na condição de estresse hídrico; c. Genótipo IAPAR 81 na condição normal de irrigação; d. Genótipo IAPAR 81 na condição de estresse hídrico.

3.5.3 Hibridização Subtrativa Supressiva de genes

A metodologia SSH tem sido utilizada com sucesso na identificação de genes diferencialmente expressos frente situações de estresse (DIOS et al., 2007; HANSEN et al., 2007), identificando genes que estão se expressando em resposta a indução do estresse hídrico o qual os genótipos IAPAR 81 e Pérola foram submetidos.

Após a verificação da qualidade e integridade do RNA foram procedidas as hibridizações subtrativa e supressiva. Ao final de cada uma das etapas, a eficiência da reação foi verificada, para então proceder com a etapa seguinte.

O produto das reações dos PCR subtrativo e supressivo podem ser visualizados na Figura 6. O padrão de peso molecular de 100 pb encontra-se na figura 6.a, seguida do produto do primeiro PCR do genótipo Pérola (Figura 6.b), e do genótipo IAPAR 81 (Figura 6.c). O produto do *Nested* PCR apresentou amplificação diferente para os genótipo Pérola e IAPAR 81. As bandas no gel, mostram o sucesso no processo de hibridização, e também, que existem genes diferencialmente expressos nos genótipos Pérola e IAPAR 81 quando submetidos a estresse por falta de água. Após as hibridizações de cDNA, restaram fragmentos diferencialmente expressos, existiam

somente nas amostras Teste e por estarem ligados aos dois adaptadores, foram amplificadas exponencialmente nos ciclos do PCR e passíveis da observação no gel.

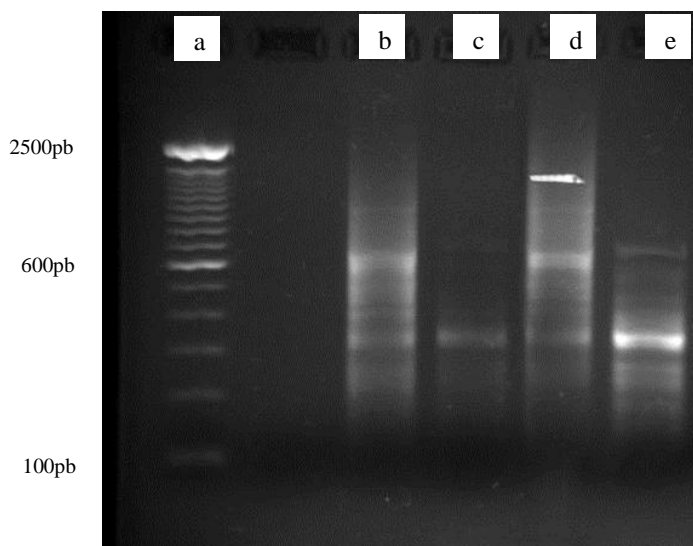


Figura 6. Produtos de PCR da hibridização subtrativa supressiva em gel de agarose 2%. a. Marcador de peso molecular de 100 pb; b. Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo Pérola; c Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo IAPAR 81; d. Produto do segundo PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo Pérola; Produto do primeiro PCR após a hibridização subtrativa supressiva do genótipo IAPAR 81.

É possível observar que o genótipo Pérola apresentou fragmentos diferencialmente expressos de diferentes tamanhos, variando de 200 até 1500 pb (Figura 6). Estes fragmentos correspondem aos genes expressos pelo genótipo Pérola em resposta ao estresse hídrico, podendo ser inferido que este genótipo quando submetido a condição de estresse expressa gene que lhe permite contornar o estresse. A identificação destes genes possibilita a construção de bibliotecas de cDNA, os quais após sequenciados podem originar a iniciadores que auxiliam na seleção assistida de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

O produto da hibridização do genótipo IAPAR 81 (Figura 6.e) apresentou poucas bandas, e apenas uma de forte intensidade, com aproximadamente 300pb. Algumas bandas apresentadas pelo genótipo IAPAR 81 também podem ser identificadas no genótipo Pérola. Esses fragmentos possivelmente correspondem a genes que são expressos na condição de estresse hídrico, porém estes não conferem a tolerância a esse estresse. Ainda analisando a Figura 6, nota-se que o genótipo tolerante apresentou um maior número de bandas em relação ao sensível, sendo estes fragmentos são provavelmente responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico. A ativação desses genes em condição de estresse ocasiona modificações morfológicas e fisiológicas, as

quais permitem ao genótipo resistir as condições adversas com pequena redução nas características de interesse.

Estudos de genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar em resposta ao estresse hídrico também encontraram genes sendo expressos no genótipo tolerante e no sensível, porém, o tolerante apresentou maior número de bandas, indicando que a maior quantidade de fragmentos diferencialmente expressos lhe conferem a tolerância ao estresse (RODRIGUES, 2008). Um banco de cDNA da interação de *T. harzianum* crescido em parede celular de *F. solani* apresentou insertos que variaram de 250 pb a 4.000 pb, (STEINDORFF, 2009), corroborando com os resultados encontrados no genótipo Pérola. A diversidade de genes que parece estar se expressando em resposta ao estresse hídrico indica que sua tolerância é uma característica poligênica (BEEVER, 2000).

A expressão fenotípica em plantas submetidas ao déficit hídrico está relacionada a expressão diferencial de genes e sua interação com o ambiente (CASAGRANDE et al., 2001). Quando a água é perdida pela célula, processos regulatórios são iniciados e o metabolismo celular é ajustado às novas condições celulares (BRAY, 1997). Alterações no crescimento e desenvolvimento começam a ocorrer, resultado das mudanças na expressão gênica (BRAY, 1993), fazendo com que os genótipos tolerem o estresse hídrico, como foi o caso do genótipo Pérola.

3.5.3.1 Construção da biblioteca de cDNA diferencialmente expresso

Uma biblioteca de cDNA corresponde a coleção de fragmentos de genes, representando as seqüências expressas em um determinado tecido ou órgão, sob influência de uma determinada condição do ambiente, em determinado momento do crescimento (MALONE et al., 2006). Tais transcritos denominados diferencialmente expressos, após a técnica da hibridização subtrativa supressiva, podem ser usados para construção de bibliotecas (AMARAL et al., 2008) e servirem de base para o seqüenciamento.

Comprovada a presença de fragmentos de genes diferencialmente expressos nos genótipos Pérola e IAPAR 81 após a HSS, estes fragmentos clonados em vetor, originaram duas bibliotecas de cDNA, uma com os transcritos do genótipo tolerante (Pérola) e outro com os transcritos do genótipo sensível (IAPAR 81). Pode ser verificado que o resultado da ligação vetor + inserto foi eficiente bem como a transformação bacteriana ocorreu com sucesso, devido a presença de colônias brancas

de *E. coli*, crescidas em meio de cultura (Figura 7). Analisando a placa de petri, verifica-se uma boa quantidade de colônias bacterianas, sendo possível inferir, que no seu interior está contida a ligação vetor + inserto, pois o plasmídeo linear de extremidades timina, somente circulariza com a união do inserto de extremidades adeninas, e assim confere a *E. coli*, a resistência ao antibiótico.



Figura 7. Colônias brancas de *E. coli*, contendo o plasmídeo recombinante; o inserto corresponde aos genes diferencialmente expressos do genótipo Pérola.

Desta forma, foram isoladas colônias, as quais deram origem a biblioteca de 579 clones de genes diferencialmente expressos do genótipo tolerante ao estresse hídrico Pérola e 384 clones do genótipo sensível IAPAR 81. Em trabalhos com ostras foram obtidos 61 clones considerados como tendo a expressão induzida pela exposição ao estresse (MEDEIROS, 2008), e em tomate 307 clones (AMARAL et al., 2008), demonstrando que o número de colônias isoladas para os genótipos Pérola e IAPAR 81 podem ser suficientes para identificar todos os genes e que estão sendo expressos em genótipos de feijão sobre déficit hídrico no florescimento.

3.5.3.2 Extração de DNA plasmidial: método da lise alcalina

As colônias bacterianas que compõem as bibliotecas construídas, possuem em seu interior o plasmídeo recombinante, sendo desta forma, necessário retirar o plasmídeo do interior da bactéria, purificar o DNA plasmidial do DNA genômico, para então

realizar o seqüenciamento e descobrir a seqüência de nucleotídeos que compõem os genes de interesse. Para esta finalidade foi utilizada a metodologia da Lise Alcalina, a qual apresenta grande eficiência nessa separação e purificação, e proporciona um DNA plasmidial com excelente qualidade, para o seqüenciamento.

Por meio da visualização do gel de agarose, pode ser verificado que a mini-preparação das oito colônias testadas (quatro do genótipo Pérola e quatro do IAPAR 81) foi efetuada com sucesso (Figura 8). Na figura, é possível distinguir as bandas correspondentes as diferentes formas que os plasmídeos podem adquirir a banda que correu mais rapidamente, a circular, a qual contém o inserto, apresenta mais de 2500 pb.

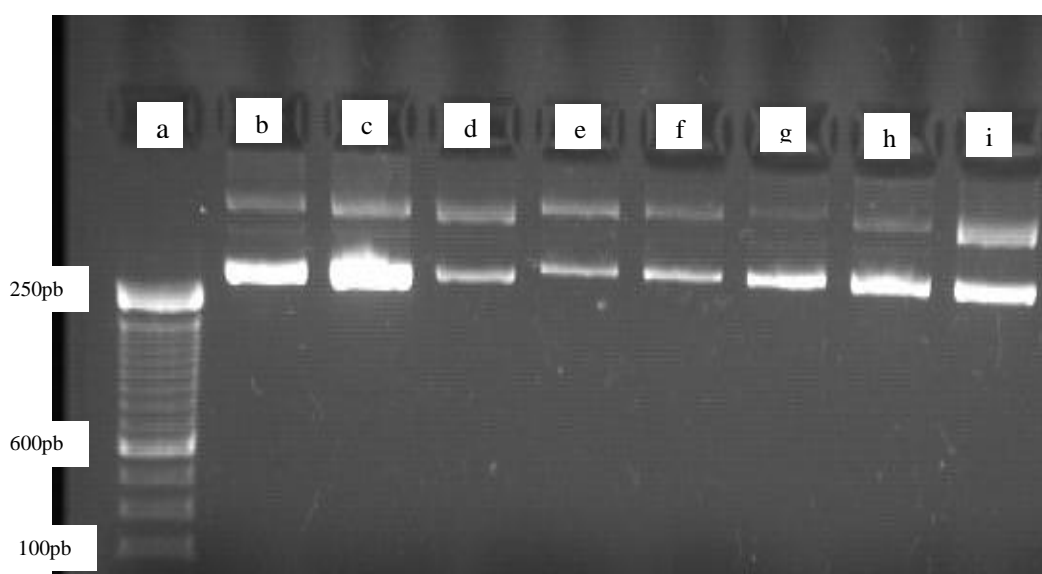


Figura 8. Perfil eletroforético de DNA plasmidial isolado de clones contendo cDNA. (a) padrão de peso molecular de 100 pb; (b,c,d,e) genótipo pérola e (f,g,h,i) genótipo IAPAR 81.

3.5.4 Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado apenas com os clones da biblioteca do genótipo Pérola, foram seqüenciados 81 clones contendo insertos diferencialmente expressos, os fragmentos apresentaram um número variável de bases, que correspondem as bandas de diferentes tamanhos aprestadas no gel da hibridização (Figura 4), 46 seqüências se agruparam em 10 grupos e as restantes foram seqüências únicas (Apêndice 2). O seqüenciamento de EST's (*expressed sequence tags*) utilizando a estratégia Sanger é um método robusto para a identificação de transcritos envolvidos em processos biológicos específicos (STEINDORFF, 2009).

As seqüências 10_1, 10_2, 10_3 e 10_44, foram as que apresentaram um maior número de clones com as mesmas seqüências. Este fato reflete que essas

seqüências estão presente em grande quantidade, ou ainda que essas seqüências devem ter multi-cópias no genoma e essas seqüências de DNA sendo associadas com a tolerância à seca, exige exploração adicional (JIANG et al., 2004). A redundância apresentada por esses clones, pode estar sugerindo serem seqüências que correspondem a genes de grande expressão em condição de estresse. Esses genes podem ter sua expressão aumentada em virtude de serem responsáveis por desencadear processos vitais para a planta que lhe possibilitam enfrentar a baixa disponibilidade de água .

A análise de homologia utilizando o bancos de dados GenBank indicaram que grande parte das seqüências apresentaram grande similaridade com outras seqüência, relacionadas a culturas como Soja entre outras (Apêndice 2). Por outro lados as seqüências, 10_3, 10_19, 10_31, 10_53, 10_57, 10_67, 10_79, 10_85, 10_87, não apresentaram similaridade com nenhuma outra seqüência (Apêndice 2), indicando serem novos genes envolvido no processo de tolerância ao estresse hídrico. Trabalho com estresse hídrico em *Haloxylon ammodendron*, também encontrou seqüências que não apresentavam homologia com outras seqüências do GenBank o que levou a conclusão de se tratarem de novos genes (JIANG et al., 2004).

As seqüências inéditas devem ser estudados com profundidade, pois podem corresponder a genes raros de difícil identificação e isolamento, os quais podem ter funções pontuais ou mesmo se tratar de fatores de transcrição de outros genes mais expressos. Fatores de transcrição normalmente são proteínas induzidas a serem expressas durante situações específicas de desenvolvimento ou interação com o ambiente (DEY e HARBORNE, 1997).

Após o seqüenciamento e a identificação dos genes diferencialmente expressos nos genótipos Pérola em resposta ao estresse hídrico, a validação dessas seqüências, bem como o estudo aprofundado de suas funções são objetivos da próxima etapa do trabalho, almejando futuramente a construção de iniciadores. Os quais poderão auxiliar os programas de melhoramento de feijão, na identificação e lançamento de cultivares, portadores de genes que conferem tolerância a este estresse. Esses genótipos irão servir para os locais aonde o estresse hídrico ocasiona perda na produtividade do feijão, quando ocorre especialmente no período do florescimento.

3.6 CONCLUSÃO

O genótipo Pérola, possui expressão diferencial de genes induzidos em resposta ao estresse o que lhe conferem a tolerância.

O genótipo sensível IAPAR 81 expressa genes em condição de estresse, que não lhe conferem tolerância.

A técnica da SSH foi eficiente no isolamento de fragmentos de genes diferencialmente expressos nos genótipos Pérola e IAPAR 81, sendo possível a construção de duas bibliotecas com esses genes.

O seqüenciamento de clones permitiu encontrar seqüências diferencialmente expressas no genótipo Pérola não descritas no banco de dados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse hídrico em plantas tem apresentando cada vez mais importância para os agricultores, devido as alterações climáticas, as quais vem aumentando a incidência de estiagens prolongadas. Esse estresse tem preocupado especialmente os pequenos produtores que cultivam o feijão. A espécie é sensível ao estresse hídrico, o qual reduz significativamente a sua produção, trazendo prejuízos econômicos a esses produtores.

Uma alternativa para reduzir o estresse hídrico enfrentado pelas cultivares de feijão utilizadas, é o uso da irrigação artificial. É um técnica muitas vezes acessível apenas a grandes produtores, devido seu alto custo. A técnica da irrigação artificial esta sendo cada vez mais questionada devido a utilização abundante de água, um recurso limitado que deverá ser utilizada de forma racional. Tendo em vista esses problemas, uma alternativa econômica, sustentável, duradoura e ecológica, é o desenvolvimento de cultivares de feijão tolerantes ao estresse hídrico. Quando a cultivar for submetidas a essa condição não irão ocorrer grandes quebras de produção, e assim poderão ser utilizadas pelas diferentes categorias de produtores.

Para maximizar o desenvolvimento destas cultivares, os melhoristas de plantas utilizam a variabilidade entre os genótipos, e através da união das técnicas da biologia molecular ao melhoramento clássico, podem lançar cultivares que carreguem consigo os genes de tolerância.

Para tal objetivo o presente trabalho chegou até a etapa do seqüenciamento dos genes diferencialmente expressos no genótipo caracterizado como tolerante ao estresse hídrico. As próximas metas do projeto são o seqüenciamento da biblioteca do genótipo sensível, validação das seqüências obtidas, estudo das proteínas codificadas por essas seqüências, construção de primers para futura utilização na seleção de genótipos de feijão que possuam os genes de tolerância ao estresse hídrico.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; ADAMS, M.W. Plant traits and yield stability of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars under drought stress. **Journal of Agricultural Science**, v. 116, p.213-219, 1991.

AGUIAR, R.S.; MODA-CIRINO, V.; FARIA, R.T.; VIDAL, L.H.I. Avaliação de linhagens promissoras de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerantes ao déficit hídrico. **Semina: Ciências Agrárias**, n.29, p.1-14, 2009.

AMARAL, D.O.J.; LIMA, M.M.A.; RESENDE, L.V.; SILVA, M.V. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v.43, p.1017-1023, 2008.

ARUNYANARK, A.; JOGLOY, S.; AKKASAENG, C.; VORASOOT, N.; NAGESWARA, R.C.; WRIGHT, G.C.; PATANOTHAI, A. Association between aflatoxin contamination and drought tolerance traits in peanut. **Field Crops Research**, n.114, p.14-22, 2009.

ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.54, p.5227-5229, June 2006.

BARBOSA, D.C.A.; NOGUEIRA, R.J.M.; MELO-FILHO, P.A. Comparative studies of growth in three species of "caatinga" submitted to water stress. **Phyton**, v.69, p.45-50, 2000.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**. V.15, p.4-7, 2000.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, Jaboticabal/SP, 2006, 247p.

BATES, B.C., Z.W. KUNDZEWICZ, S. WU AND J.P. PALUTIKOF, EDS. Climate change and water. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change, **IPCC Secretariat**, 2008, 210 p.

BEEBE, S.E.; IDUPULAPATI, R.A.O.; MATTHEW, W.B.; BUTARE, L. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. **Crop Science**, n.6, p.583-592, 2006.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiol**, v,103, p.1035-1040, 1993.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends Plant Sci**, v.2, p.48-54, 1997.
CAMPOS, N.A.; ALVES, J.D.; PORTO, B.N.; SOUZA, K.R.D.; SANTOS, M.O.; SILVEIRA, H.R.O.; MAGALHÃES, M.M. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P.K.; BRETON, M.C.; NEPOMUCENO, A.L. Expressão Gênica Diferencial Durante Déficit Hídrico Em Soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.3, p.168-184, 2001.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2010 / Companhia Nacional de Abastecimento** – Brasília: Conab, 2010.

COSTA, J.R.; PINHO, J.L.M.; PARRY, M.M. Produção de matéria seca de cultivares de milho sob diferentes níveis de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n.12, p.443–450, 2008.

CORTNER, J.; WOUDE G.F.V. Essentials of molecular biology – cDNA libraries. In: *Cancer: Principles and practice of oncology*. DeVita V.T. Jr., Hellman S. and Rosenberg S.A. (ed), 5th ed, Lippincott – **Raven Publishers**, 1997.

CUSTÓDIO, C.C.; VIVAN, M.R.; NUNES, R.C.A.; AGOSTIN, E.A.T. Tolerância cruzada induzida por choque térmico na germinação de semente de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, n.31, p.131-143, 2009.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. *Plant Biochemistry*. **Academic Press, San Diego, CA**, 1997, 554 p.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc Natl Acad Sci**, v.93, p.6025–6030, 1996.

DIOS, S.; POISA-BEIRO, L.; FIGUERAS, A. & NOVOA, B. Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. **Molecular Immunology**. v. 44, p.2195-2204. 2007.

GASIC, K.; KORBAN, A.H.S.S. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.22, p.437–437, 2004.

GARRIDO, M.A.T. **Respostas do feijoeiro às lâminas de água e adubação nitrogenada**. 205 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, MG, 1998.

GUIMARÃES, G.M.; STONE, L.F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n.10, p.70 – 75, 2006.

GURSKAYA, N.G.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P.D.; KHASPEKOV, G.L.; LUKYANOV, K.A.; VAGNER, L.L.; ERMO-LAEVA, O.D.; LUKYANOV, S.A.; SVERDLOV, E.D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Anal Biochem**, n. 240, p.90-97, 1996.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; LUCON, C.M.M.; TSAI, S.M. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e b-1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.376-381, 2004.

HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; NORDTUG, T. & OLSEN, A.J. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. v.2, p.250-256, 2007.

HUGHES, D.F.; JOLLEY, V.D.; BROWN, J.C.; Role for potassium in the iron-stress response mechanism of iron-efficient oat. **Soil Science Society of America Journal**, n.56, p.830-835, 1992.

IBGE - Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Março 2010.

Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201003_5.shtm. Acesso em: 21/08/2010.

JIANG, H.; KANG, D.; ALEXANDRE, D.; FISHER, P.B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **PNAS** v.97, 2004.

JÚNIOR, N.J.M.; BRITO, O.R.; SILVA, N.; JÚNIOR, F.; FONSECA, I.C.B.; AUIAR, S.X. Nutrição mineral e produção de feijão em áreas manejadas com e sem queima de resíduos orgânicos e diferentes tipos de adubação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p.7-18, 2011.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, A. S.; ARIAS, L. N.; MENEGHELLO, G. E.; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de ecótipos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa agropecuária tropical**, Protocolo PAT 673/2005, 2006.

MEDEIROS, I.D. Expressão gênica diferencial em ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto doméstico. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular, Curitiba, 2008, 132p.

MICHELETTO, S.; RODRIGUEZ-URIBE, L.; HERNANDEZ, R.; RICHINS, R. D.; CURRY, J.; O'CONNELL, M. A. Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. **Plant Science**, v. 173, p. 510-520, 2007.

MOLINA, J.C.; MODA-CIRINO, V.; JÚNIOR, N.S.F.; FARIA, R.T.; DESTRO, D. Response of common bean cultivars and lines to water stress. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n.1, p.363-372, 2001.

NESI, C.N.; GARCIA, A.A.F. Decomposição ortogonal de graus de liberdade de tratamentos utilizando variáveis auxiliares e o PROC GLM do SAS. **Bragantia**, n.1, p.157-167, 2005.

OLIVEIRA, A.D.; FERNANDES, E.J.; RODRIGUES, T.J.D. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. **Engenharia Agrícola**, n.25, p.86-95, 2005.

PIMENTEL, C.; LAFFRAY, D.; LOUGUET, P. Intrinsic water use efficiency at the pollination stage as a parameter for drought tolerance selection in *Phaseolus vulgaris*. **Physiological Plantarum**, v.106, n.2, p.184-189, 1999.

PRICE, A. H.; TOWNEND, J.; JONES, M. P.; AUDEBERT, A.; COURTOIS, B. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines and West Africa. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.683-695, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; SILVA, G.S.; DIAS, L.A.S. Genetic plant improvement and climate changes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, n.9, p.189-195, 2009.

RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought and high salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analices. **Plant Physiology**, Bethesda, v.133, p.1755-1767, 2003.

RABELLO, A.R; RANGEL, P.H.N.; GUIMARÃES, C.M.; SALES, R.O.B.; SILVA, F.R.; COSTA, M.M.C.; TOGAWA, R.C.; FERREIRA, M.E.; MEHTA, A. **Expressão**

diferencial em genótipos de *oryza sativa* contrastantes para a tolerância a seca. Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 21p.

RODRIGUES, F.A. **comparação do padrão de expressão gênica de plantas de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2008.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc: **numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.** New York: Exeter Software, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 720p.

SANTOS, C.S.R.; MOREIRA, J.A.N.; FARIAS, R.H.; DUARTE, J.M. Classificação de genótipos de amendoim baseada nos descritores agromorfológicos e isoenzimáticos. **Ciência Rural**, n.30, p.55-59, 2000.

SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Functional & Integrative Genomics**, n.6, p.282-291, 2002.

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**, n.25, p.89-96, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, n.7, p.161-167, 1996.

SINGH, S.P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. **Crop Science**, n.35, p.118-124, 1995.

STEINDORFF, S.S. **Construção e análise de uma biblioteca de cdna de *Trichoderma harzianum* crescido na presença de parede celular de *Fusarium solani*.** Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, 2009, 71p.

SOUSA, M.A.; LIMA, M.D.B.; SIMON, G.A.; ANDRADE, J.W.S. Efeito do estresse hídrico na densidade do comprimento radicular em estádios de desenvolvimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, n.39, p.25-30, 2009.

SOUZA, M.G.; AIDAR, S.T.; GIAVENO R.F. Drought stability in different common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Crop Breed. Appl. Biotech**, n.3, p.203-208, 2003.

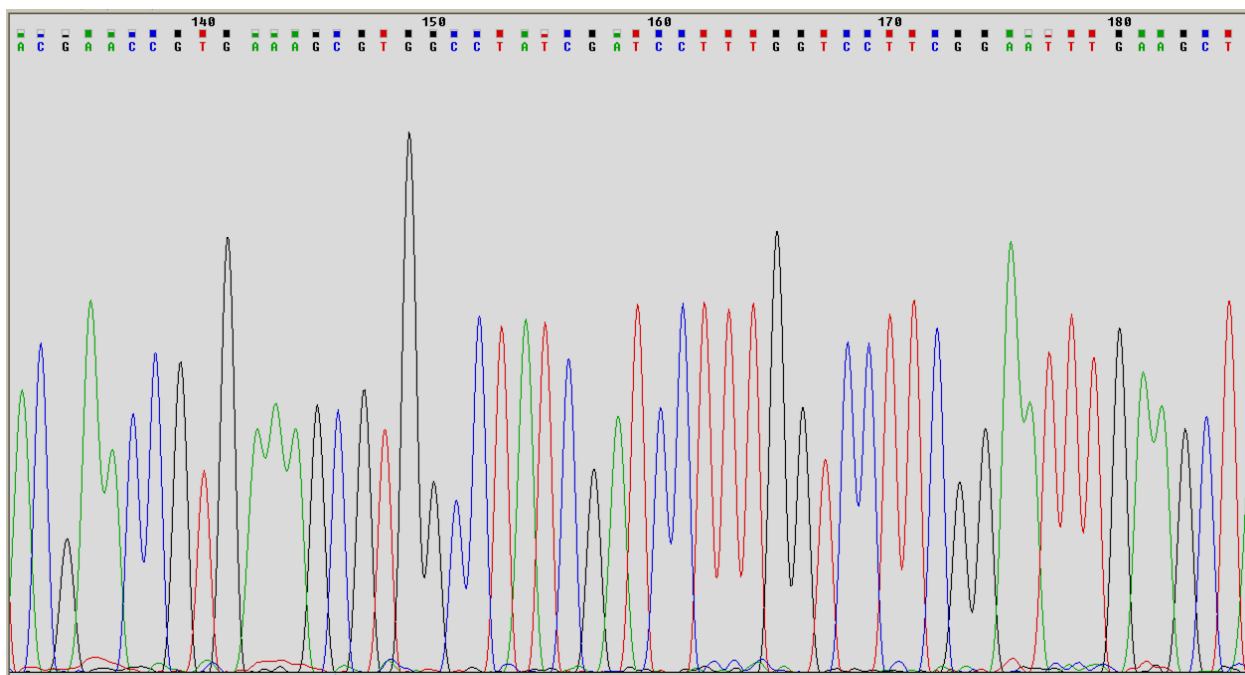
TURNER, N.C. Further progress in crop water relations. **Advances in Agronomy**, v.58, p.293-338, 1997.

VIBRANS, A.C.; SCHRAMM, V.F. Perfil temporal de EVI/NDVI na bacia hidrográfica do rio Itajaí em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 14. (SBSR), 2009, Natal. *Anais...* São José dos Campos: INPE, 2009. p. 1581-1588. DVD, On-line. ISBN 978-85-17-00044-7. Disponível em: <<http://urlib.net/dpi.inpe.br/sbsr@80/2008/10.17.15.49>>. Acesso em: 27/ 08/2010.

WHITFIELD, C.W.; BAND, M.R.; BONALDO, M.F.; KUMAR, C.G.; LIU, L.; PARDINAS, J.; ROBERTSON, H.M.; SOARES, B.; ROBINSON, G. E. Annotated Expressed Sequence Tags and cDNA Microarrays for Studies of Brain and Behavior in the Honey Bee. **Genome Res**, v.12, p.555-566, 2002.

ZHUANG, Y.; REN, G.; YUE, G.; LI, Z.; QU, X.; HOU, G.; ZHU, Y; ZHANG, J. Effects of water-deficit stress on the transcriptomes of developing immature ear and tassel in maize. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2137-2147, 2007.

APÊNDICE



Apêndice 1. Perfil de um eletroferogramas gerado a partir do seqüenciamento do clone 10_1, contendo um fragmento diferencialmente expresso em resposta ao estresse hídrico e feijão.

Apêndice 2. Identificação dos 81 clones contendo fragmentos diferencialmente expressos em resta ao déficit hídrico em feijão, os quais seqüenciados. Seqüência de nucleotídeos, número de clones com o mesmo fragmento, acesso no GenBank da seqüência com homologia, E value e descrição da seqüência com maior homologia ao clone seqüenciado.

Clone	Seqüência original	N. de clones	Seqüência de comparação		
	Seqüência de nucleotídeos		Descrição	e-value	Accesso
10_1	GTACGAATACGAACCGTGAAAGCGT GGCCTATCGATCCTTTGGTCCTTCGG AATTTGAAGCTAGAGGTGTCAGAAA AGTTACCACAGGGATAACTGGCTTG TGGCAGCCAAGCGTTCATAGCGACG TTGCTTTTTGATCCTTCGATGTCGGC TCTTCCTATCATTGTGAAGCAGAATT CACCAAGTGTTGGATTGTTACCCA CCAATAGGGAACGTGAGCTGGGTTT AGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTT TACCCTACTGATGACAGTGTCGCAA TAGTAATTCAACCTAGTACCTCGGC CGGGCGGCCGCTCG	14	<i>Humulus lupulus</i>	8e-150	AF223066.1
10_2	GTACGAGAGGAACCGTTGATTCGCA CAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAA AAGCCAGTGGCGCGAAGCTACCGTG CGTTGGATTATGACTGAACGCCTCT AAGTCAGAATCCGGGCTAGAAGCG ATGCGTGCGCCCGCCGTTTGTGGCC GACCAGCAGTAGGGGGCCTTGGCCC CCCAGAGGCACGTGCCGTTGGTGAC CCTCGTAAGGTGAATCAGCCTTGCG AGACGCCTTGAAGCGCAATTCCTAT CGAGCGGCGGGTAGAATCCTTTGCA CCTCGGCCGCGACCACGCT	14	<i>Glycine max</i>	6e-121	EU036356.1
10_3	ATGAACTCCATAAAAGCTAAAGTTG AACTAAAAAGATGAAGCCTTTGAGA GGTAAGGAAAGCAACTAAAGAAAA CAAAAATGTTGCTTCACAATGTATT TACACAAACTCACCCAAACAAAACC TAAGCCACTAAATTTCCAAAATACA ACTAGACTGCAAATGCCAGTGTAT TCTTCCGGGCTCACAACCTCGGCCG CGACCACGCT	3	N	N ¹	N
10_44	ACCCCAAACCGACACAGGTTAACAA GTAGAGTATACTAGGGCGCTTGAGA	3	<i>Beta vulgaris</i>	2e-105	FP8858

	GAACCATGTCTCGAAGGAACTCGNCNN AATGACCCCGTAACTTCGGGAGAAG GGGTGCTCTCCTATCTTTTGATTAGG AAAGCGGCACATACCAGGGGGTAG CGACTGTTTATTA AAAACACAGGAC TCTGCTAAGTGGTAACACGATGTAT AGAGTCTGACACCTGCCCCGGGCGGC CGCTCGA		subsp. maritima	71.1
10_6	ACACAGTAACAGGGATCCTAAGTCT TGATTCACACTGCAACAGAAGTTGA AGTTAGTGACACATCGAGAATCTCA GTCAACTTCTTCAATCTTAGGTCCAG CACCAGAACCAGCACCAGATCCAGC ACCAGGCATGTCATCAGCCATAGGA ACATCTCCAGCAGCACCACCCTGAT ACATCTTAGCAATGATGGGGTTGCA TATCCCTTCCA ACTCCTTCTGCCTGT CCTCAAATTCATCCACTTCCGCCATC TGGTTCCCCTCCAGCCACTGTATTGC ATCCTCCACAGCCTTCTCAATCTTCT GTTATCATCCGCCTCCA ACTTCCCC CCGATCTTCTCGTCCTTTATCGACCT CGGCCGCGACCACGCTAATCGA	2	-	- ²
10_19	CCAAATAACAGAAAACCTAAAATA GGAACATGGGGTCTATAACAGTGCA CAAAAATTGTATCTAACTCTGAAAT AACTTCTGCACCCAAATGGAAA ACT CCCCCTAAACCTCATCTAGTAATTT TGTGAATAATCAAAGCTCAATGGGC GTTGACCGAATGGAGCCTGGAAAAT AGCATGTCTAAAACCTGCCCGGGCG GCCGCTCGA	2	N	N N
10_33	TGTCAGACTCTATACATCGTGTTACC ACTTAGCAGAGTCCTGTGTTTTTAAT AAACAGTCGCTACCCCTGGTATGT GCCGCTTTCCTAATCAAAAAGATAGG AGAGCACCCCTTCTCCCGAAGTTAC GGGGTCATTTTGCCGAGTTCCTTCG ACATGGTTCTCTCAAGCGCCCTAGT ATACTCTACTTGTTAACCTGTGTCGG TTTGGGGTACCTCGGCCGCGACCAC GCT	2	<i>Ricinus communis</i>	HQ 6e- 105 874 649. 1
10_35	TAAATACGCGACGGGGTATTGTAAG	2	<i>Glycine</i>	1e- EU0

	TGGCAGAGTGGCCTTGCTGCCACGA TCCACTGAGATTCAGCCCTTGTCCT TTGATTCGTCTGCAAAGGATTCTAC CCGCCGCTCGATAGGAATTGCGCTT CAAGGCGTCTCGCAAGGCTGATTCA CCTTACGAGGGTCACCAACGGCACG TGCCTCTGGGGGGCCAAGGCCCCCT ACTGCTGGTCGGCAAACAAACGGCG GGCGCACGCATCGCTTCTAGCCCGG ATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCA TAATCCAACGCACGGTAGCTTCGCG CCACTGGCTTTTCAACCAAGCGCGA TGACCAATTGTGCGAATCAACGGTT CCTCTCGTACCTGCCCGGGCGGCCG CTCGA		<i>max</i>	123	363 56.1
10_66	TACTGGAAATCAGAATCAAACGAGC TTTTACCCTCTTGTTCCACACGAGAT TTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAG GACACCTGCGTTATCTTTAACAGA TGTGCCGCCCCAGCCAAACTCCCA CCTGACAATGTCTTCCGCCCGGATC GACCGGCCGAGGCCGACCTTGGGTC CAAAAAGAGGGGCAGCGCCCCGCTT CCGATTCACGGAATAAGTAAAATAA CGTTAAAAGTAGTGGTATTTCACTTT CGCTGTTTCCAGCTCCCCTTATCCT ACACCTCTCAAGTCATTTACAAAG TCGGACTAGAGTCAAGCTCAACAGG GTCTTCTTTCCCCGCTGATTCCGCCA AGCCCGTTCCCTTGGCTGTGGTTTCG CTGGATAGTAGACAGGGACAGTGG GAATCTCGTTAATCCATTCATGCGC GTCACTAATTAGATGACGAGGCATT TGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTT ACTCCCGCCGTTTACCCGCGCTTGGT GGAT	2	<i>Glycine max</i>	0,0	AK 286 061. 1
10_69	ACTAGGTTGAATTACTATTGCGACA CTGCCATCAGTAGGGTAATCGAGCG GCCGCCCGGGCAGGTACACTTTAAC AGGGATCCTAAGTCTTGATTCACAC TGCAACAGAAGTTGAAGTTAGTGAC ACATCGAGAATCTCAGTCAACTTCT TCAATCTTAGACCTCGGCCGCGACC	2	<i>Shepherd ia canadens is</i>	3e-12	AF4 791 00.1

ACGCT					
10_9	ACAGATACCCCTTCTACGTGAAGTC AATATTATATTTTCCTTTGGCTCAAG CAACAATCCAATCACCATAATACCC CTATCCATCTCTAACTTTTACCCAAC CCACAAGGCCAATCACGTCAATTCA ACAATAAAAACCTCTCGTCACGTCTA ACTCACGTGACTTCCACCCTACGAC GCTTGCGGCAAGGGAAACGACGTCG TTACCGCCACGCTGCTGTGATCCTTG CAACTCAGTGCTTTCAGTATTCTCCA TGACACCTGCCCCGGGCGGCCGCT	1	-	-	-
10_13	GCCGCCCGGGCAGGTACCTTTCAA AGAACAATTACTCAGATATCTTTAC TTACCCTGGGACATGAACCTCCTTT GGGTTTTTAATTCACTTAACTCTTTT CGGATTCGAATCTAAGAAAAAGAA AAAAACGAAAACAATAAAATAAA AAAGAATAATTCGAAAAATGATGA AAGATTTTCGTTGCAATTTAATTGAA TCTAGTACCTCGGCCGCGACCACGC T	1	<i>Phaseolu s vulgaris cultivar Negro Jamapa</i>	5e-96	DQ 886 273. 1
10_16	ACAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTGTTTTCGGATATTGGA CGCATCAACTTGTTATGAAATAACA TTGATAGCCTCTACTCGTGTTCTAGC TCGTCTAAGATTTAGATTTGCCTCAA TTGTTTGTCTCTTGCCTTCAGCCTGA TTCAAATTAGTTTCTCTATTTCAAGA GTTTGTGTGCTTCTTGTGGATCAAT GTCACTCCCCTTTTCCGCATCATTTA CTAAACAGTTATCTCATTATTGTTT ATTCTAGCAAACCCCCCATCAAAG CCATTGTTAACCATTGATCTTTAAGA CGTATTCTCAAATACCTATATCAA CAGCTGAGGCAATAGGCGCATGA	1	<i>Phaseolu s vulgaris</i>	9e- 170	EU1 967 65.1
10_18	TAAAAGAACTAACAAGGATTCCCC TAGTAACGGCGAGCGAACC GGGA AAGCCCACCATGAGAATCGGTCGCC TTCGGCGTTCGAATTGTAGTCTGGA GAAGCGTCCTCAGTGGCGGACCGGG CCCAAGTCCCCTGGAAGGGGGCGCC AGAGAGGGTGAGAGCCCCGTTGTGC	1	<i>Glycine max</i>	7e- 120	AY 935 814. 1

	CCGGACCCTGTCGCACCACGAGGCG CTGTCGGCGAGTCGGGTTGTTTGGG AATGCAGCCCCAATCGGGCGGTAAA TCCCCACCTCGGCCGCGACCACGCT				
10_24	AAACAAACGGCGGGGCGCACGCATC GCTTCTAGCCCGGATTCTGACTTAG AGGCGTTCAGTCATAATCCAACGCA CGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTTTTC AACCAAGCGCGATGACCAATTGTGC GAATCAACGGTTCCTCTCGTACCTC GGCCGCGACCACGCT	1	<i>Pisum sativum</i>	3e-67	AB0 497 23.1
10_27	GAAATCAGAATCAAACGAGCTTTTA CCCTTTTGTTCCACACGAGATTTCTG TTCTCGTTGAGCTCATCTATGGACAC CTGCGTTATCTTTTAACAGATGTGCC GCCCCAGCCAAACTCCCCACCTGAC AATGTCTTCCGCCCCGGATCGACCGG CCGAAGCCGACCTTGGGTCCAAAAA GAGGGGCAGCGCCCCGCTTCCGATT CACGGAATAAGTAAAATAACGTAA AAGTAGTGGTATTTCACTTTCGCTGT TTCCAGCTCCCCTTATCCTACACCT CTCAAGTCATTTACAAAGTCGGAC TAGAGTCAAGCTCAACAGGGTCTTC TTCCCCGCTGATTCCGCCAAGCCC GTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTGGA TAGTAGACAGGGACAGTGGGAATCT CGTTAATCCATTCATGCGCGTCACT AATTAGATGACGAGGCATTTGGCTA CCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCC GCCGTTTACCCGCGCTTGGTTGAATT TCTTCACTTTGACATTCAGAG	1	<i>Glycine max</i>	0.0	AK 286 061. 1
10_30	ACGAATACGAACCGTGAAAGCGTG GGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACAGA CCGAACCTAACCAAACGGGTTTTCC GGCGACTTATTTATCCACAATTCTA AAGCTTCGTCATATGATCACGCCCCG TTTTCATGTGACTAGTTTATCCTTGC AACCAATGATACCACAGGCTACTCT GCCACCAGCATTTCCTGTACCTCGG C	1	<i>Vitis vinifera</i>	2e-05	AM 440 561. 2
10_31	GTGTCCATTA AAAATGGTTTTTCATAT GTCTTGAAAGCAAATAACACACAAT	1	N	N	N

	GTTCTAGAATCCATAATTCCACATC ACATGATTAATAACCAGAACACACT AGATATAACCACAATAACAGAACTCA AATTATCTATGCCCAGCACATAGGC TAGCTGGTAAGACTTGATACTTGAG ACCCAATCGCTTAGACCTCGGCCG CGACCACGCTAATCGA				
10_32	GTACATTTATTCTTTTTCTTTCATGC GTGTGTATCACTTCTTGTGATCCTTA CTTTAAATGTATGTGAATGAACATC ATTTTGCCTAATTCAGCTTAGACAG CAAAAAGAGGCAACCAGAAGAAAG GAGGACAGAAACACAGAAGCATAG CAAATCCACAGGAGTGTGTATGGAA GCTTTCTTACTTTTGTCAAACAACCC AAACCTCGGCCGCGACCACGCT	1	<i>Soybean</i>	1e-56	BT0 922 64.1
10_36	ACTATGTGAAATCCTCGGTTTTTCC TCTTTCTCTATCCCTATCTCGTAGGT AGAGCGTTTGAATCAATTTAGAACT CTTTCTTCTGTATCTGGATGAATCGA TATGATTACATTCCAATTCCTTCCCG ATACCTCGGAACCGAATTGAATCCC AAATTGACGGGTTAGTGTGAGCTTA TCCATGCGGTTATGCACCCTTCGAA TAGGAATCTATTTTCTGAAAGATCC CAGCTTTCGTGCGTTGGTGGGTCTTC GAGATCCTTTCGATGACCTATGTTGT GTTGAAGGGATATCTATATGAAAAG ACAGTTCTATACCTGCCCGGGCGGC TCG	1	<i>Phaseolu s vulgaris cultivar Negro Jamapa</i>	2e- 160	DQ 886 273. 1
10_39	GTCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCT GAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGA GGAAAAGAACTAACAAGGATTCC CCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGG AAAAGCCCACCATGAGAATCGGTCTG CCTTCGGCGTTCGAATTGTAGTCTG GAGAAGCGTCCTCAGTGGCGGACCG GGCCCAAGTCCCCTGGAAGGGGGCG CCAGAGAGGGTGAGAGCCCCGTTGT GCCCGGACCCTGTCGCACCACGAGG CGCTGTCGGCGAGTCGGGTTGTTTG AGAATGCAGCCCCAATCGGGCACCT CGGCCGCGACCACGCT	1	<i>Perrottet ia longistyli s</i>	6e- 126	AY 935 805. 1

10_40	GTC AATGATCAGCATGAATAATAAT TCTCTTTTCTAATTTGCAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT GTCCCTCGGCCGCGACCACGCT	1	<i>Phaseolu s vulgaris</i>	2e-11	DQ 459 505. 1
10_49	CAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT ACTGACAAGGTTGAAGCGATTCTCT CTAATTTTTTATAGATAGTTTTTCGGG AATCAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAGCTTGACCTGCCCGGGCGG CCGCTCGA	1	<i>Phaseolu s vulgaris</i>	5e-29	EU1 967 65.1
10_53	ACTTGGTGTGGTATGCATTCTTCGCA GACCCTGCTAACAAACACGCCTCTG CTCCAGAAAATAATCCNGNANAG GATGAAGGATACGACGGCGCAAGT GGCGGAGCAACCGGAAACAAGCCC TTTGCCGCAGCATAGGCATCGAGTG ACGCCGTTGAGGACGGCCTGGCTGA GGAGCAGGAGAGCGACGGCGGCCGA GGCCGTANATGGTGGAGGCGTCGGT GGTGACCTGCCCGGGCGGCCGCTCG	1	N	N	N
10_56	TACTAGGTTGAATTACTATTGCGAC ACTGTCATCAGTAGGGTAAACTAA CCTGTCTCACGACGGTCTAACCCAG CTCACGTTCCCTATTGGTGGGTGAA CAATCCAACACTTGGTGAATTCTGC TTCACAATGATAGGAAGAGCCGACA TCGAAGGATCAAAGAGCAACGTCGC TATGAACGCTTGGCTGCCACAAGCC AGTTATCCCTGTGGTAACTTTTCTGA CACCTCTAGCTTCAAATTCGAAGG ACTAAAGGATCGATAGGCCACCTCG GCCGCGACCACGCT	1	<i>Glycine max</i>	6e- 136	AK 286 061. 1
10_57	CCCGGGCAGGTAATAAAAAAAAAACT TTTATTCACTCTTGATGAACTTCAC ATCACTAAGCTTACATTTTGTAGACC AAAACAATAACAGAATTCACAGAGT ACCTCGGCCGCGACCACGCT	1	N	N	N
10_60	GTCTTTGCAGACGACTTAAATACGC GACGGGGTATTGTAAGTGGCAGAGT GGCCTGCTGCCACGATCCACTGAGA TTCAGCCCTTGTCGCTTTGATTCGTC TGCAAAGGATTCTACCCGCCGCTCG ATAGGAATTGCGCTTCAAGGCGTCT	1	<i>Glycine max</i>	1e- 123	EU0 363 56.1

	CGCAAGGCTGATTCACCTTACGAGG GTCACCAACGGCACGTGCCTCTGGG GGGCCAAGGCCCCCTACTGCTGGTC GGCAAACAAACGGCGGGCGCACGC ATCGTTCTAGCCCGGATTCTGACTT AGAGGCGTTCAGTCATAATCCAACG CACGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTT TTCAACCAAGCGCGATGACCAATTG TGCGAATCAACGGTTCCTCTCGTAC CTCGGCCGCGACCACGCT				
10_62	TTGGGGCAAATCACTGATTCCATCC TCATCTCCTCACAGCTTGTCAAGAT GTTCTTCTCTTGGTACCTGCCCGGGC GGCCGCTCGACGAATACGAACCGTG AAAGCGTGGCCTATCGATCCTTTAG TCCTTCGGAATTTGAAGCTAGAGGT GTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAA CTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCA TAGCGACGTTGCTTTTTGATCCTTCG ATGTCGGCTCTTCCTATCATTGTGAA GCAGAATTCACCAAGTGTGGATTG TTCACCCACCAATAGGGAACGT GAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGA CAGGTTAGTTTTACCCTACTGATGA CAGTGTCGCAATAGTAATTCAACCT AGTACCTCGGCCGCGACCACGCT	1	<i>Glycine max</i>	6e- 152	AK 286 061. 1
10_64	GTATAGAACTGTCTTTTCATATAGAT ATCCCTTCAACACAACATAGGTCAT CGAAAGGATCTCGAAGACCCACCAA CGCACGAAAGCTGGGATCTTTCAGA AAATAGATTCTTATTCGAAGGGTGC ATAACCGCATGGATAAGCTCACACT AACCCGTCAATTTGGGATTCAATTC GGTTCCGAGGTATCGGGAAGGAATT GGAATGTAATCATATCGATTCATCC AGATACAGAAGAAAGAGTTCTCTAT TGATTCAAACGCTCTACCTACGAGA TAGGGATAGAGAAAGAGGAAAAAA CCGAGGATTTACATAGTACCTCGG CCGCGACCACGCT	1	<i>Phaseolu s vulgaris cultivar Negro Jamapa</i>	9e- 165	DQ 886 273. 1
10_67	TACACTTAACAAAAGCACGCCATA TCTGCGTTTTTTACATATTTACAGCT AACCGACACAACCATAACTAGTTTA	1	N	N	N

	ACAGTAGACAACTAAGACACCTCG GCCGCGACCACGCTAATCGA				
10_72	GCCCCCAGAGGCACGTGCCGTTGG TGACCCTCGTAAGGTGAATCAGCCT TGCGAGACGCCTTGAAGCGCAATTC CTATCGAGCGGCGGGTAGAATCCTT TGCAGACGAATCAAAGCGACAAGG GCTGAATCTCAGTGGATCGTGGCAG CAAGGCCACTCTGCCACTTACAATA CCCCACCTGCCCGGGCGGCCGCTCG AAATCGA	1	<i>Glycine max</i>	2e-35	AK 286 061. 1
10_74	GTACGAGAGGAACCGTTGATTCGCA CAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAA AAGTCAGTGGCGCGAAGCTACCGTG CGTTGGATTATGACTGAACGCCTCT AAGTCAGAATCCGGGCTAGAAGCG ATGCGTGCGCCCGCCGTTTGTGGCC GACCAGCAGTAGGGGGCCTTGGCCC CCCAGAGGCACGTGCCGTTGGTGAC CCTCGTAAGGTGAATCAGCCTTGCG AGACGCCTTGAAGCGCAATTCCTAT CGAGCGGCGGGTAGAATCCTTTGCA CCTGCCCGGGCGGCCGCTCGATCGC TATGA	1	<i>Glycyrrh iza uralensis</i>	8e- 120	EF5 712 99.1
10_75	ACTAGATTCAATTAATGCAACGA AATCTTTCATCATTTTTCGAATTATT CTTTTTATTTAGTTGTTTTCGTTTT TTTTCTTTTTCTTAGATTCGAATCCG AAAAGAGTTAAGTGAATTA AAAACC CAAAGGAGGTT CATGTCCCAGGGTA AAGTAAAGATATCTGAGTAATTGTT CTTTTGAAAGGTACCTGCCCGGGCG GCCGCTCGA	1	<i>Nicotian a benthami ana</i>	8e-04	AY 974 606. 1
10_76	GGGTATTGTAAGTGGCAGAGTGGCC TTGCTGCCACGATCCACTGAGATTC AGCCCTTGTCGCTTTGATTCGTCTGC AAAGGATTCTACCCGCCGCTCGATA GGAATTGCGCTTCAAGGCGTCTCGC AAGGCTGATTCACCTTACGAGGGTC ACCAACGGCACGTGCCTCTGGGGGG CCAAGGCCCCCTACTGCTGGTTCGGC AAACAAACGGCGGGCGCACGCATC GCTTCTAGCCCGGATTCTGACTTAG	1	<i>Mung bean</i>	1e- 108	X17 211. 1

	AGGCGTTCAGTCATAATCCAACGCA CGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTTTTC AACCAAGCGCGATGACCAATTGTGC GAATCAACGGTTCCTCTCGTACCTG CCCGGGCGGCCGCTCGA				
10_77	GCGCAATTCCTATCGAGCGGCGGGT AGAATCCTTTGCAGACGAATCAAAG CGACAAGGGCTGAATCTTAGTGTGA TCGTGGCAGCAAGGCCACTCTGCCA CTTACAATACCCCGTCGCGTATTTA AGACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGA	1	<i>Medicag o ruthenic a</i>	2e-32	AY 256 424. 1
10_78	TACACGGTAACAGGGATCCTAAGTC TTGATTCACACTGCAACAGAAGTTG AAGTTAGTGACACATCTTAGAACGT CAGTCCACTTCTTCAATCTTAGGTAG CACCAGAACCAGCACCAGATCCAGC ACCAGGCATGTCATCAGCCATAGGA ACATCTCCAGCAGCACCACCCTGAT ACATCTTAGCAATGATGGGGTTGCA TATCCCTTCCAACCTTCTGCTTGT CCTCAAATTCATCCACTTCCGCCATC TGGTTCCCCTCCAGCCACTGTATTGC ATCCTCCACAGCCTTCTCAATCTTCT GCTTATCATCCGCCTCCAACCTCCCC CCGATCTTCTCGTCCTTTATCGACCT CGGCCGCGACCACGCTA	1	-	-	-
10_79	GTATGAGTGAACCATATTTTTATGC ATTAAGCGGTTAACAGTATAATATT CTATTATTTTTTTTCCAACCTTTTATT TTGGTGATAGCATATGTGTGGCAGT GGCAGCTAAAGTCTAACCTGTATAG CATTGCGTTGCGTCTTTAAGCTTTTG GAAGGGTTCATTACATTAGGTAGT GAGTGTGACCCAGCTGTAATAATTT CAGATTAGGCATAACTGTAGTCTCT ATGTCAATGTTGGTTTCAGTGCTTTT ACTTTCAAAAAGATCCAATAGGATA GCGAGTTGGTACCTCGGCCGCGACC ACGCT	1	N	N	N
10_83	CTGCAAAGGATTCTACCCGCCGCTC GATAGGAATTGCGCTTCAAGGCGTC TCGCAAGGCTGATTTACCTTACGAG GGTCACCAACGGCACGTGCCTCTGG	1	<i>Sesbania drummo ndii</i>	3e- 119	DQ 465 815. 1

	GGGGCCAAGGCCCCCTACTGCTGGT CGGCAAACAAACGGCGGGCGCACG CATCGCTTCTAGCCCGGATTCTGACT TAGAGGCGTTCAGTCATAATCCAAC GCACGGTAGCTTCGCGCCACTGGCT TTTCAACCAAGCGCGATGACCAATT GTGCGAATCAACGGTTCCTCTCGTA CCTCGGCCGCGACCACGCT				
10_87	CCGGGCAGGTCAAACACGTAAAAA ATGTTTTTTCACAGTAAAAAAAATCG GTATTATTACGTGTTTGTGCATCCAT TGCACTTCACTTCATATATTTATAGA GGAGTTTCACCTCGGCCGCGACCAC GCT	1	N	N	N
10_88	GCAATTCCTATCGAGCGGCCGCCCG GGCAGGTATCCTTTGCAGACGAATC AAAGCGACAAGGGCTGAATCTCAGT GGATCGTGGCAGCAAGGCCACTCTG CCACTTACAATACCCCGTCGCGTAT TTAAGTCGTCTGCNAAGGATTCTAC CCGCCGCTCGATAGGAATCGCGCTT CAAGGCGTCTCGCAAGGCTGATTCA CCTTACGAGGGTCACCAACGGCACG TGCTCTGGGGGGCCAAGGCCCCCT ACTGCTGGTCGGCAAACAAACGGCG GGCGCACGCATCGCTTCTAGCCCGG ATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCA TAATCCAACGCACGGTAGCTTCGCG CCACTGGCTTTTCAACCACGCGATG ACCGTATAC	1	<i>Glycine max</i>	4e- 149	AK 286 061. 1
10_89	GGGAGCTGGAAACAGCGAAAGTGA AATACCACTACTTTTAAACGTTATTTT ACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGG GCGCTGCCCTCTTTTTGGACCCAA GGTCGGCTTCGGCCGGTCGATCCGG GCGGAAGACATTGTCAGGTGGGGA GTTTGGCTGGGGCGGCACATCTGTT AAAAGATAACGCAGGTGTCCTAAGA TGAGCTCAACGAGAACAGAAATCCC GTGTGGAACAAAAGGGTAAAAGCT CGTTTGATTCTGATTTCAGTACCTG CCCGGGCGGCCGCTCGAATCGA	1	<i>Glycine max</i>	2e- 135	AK 286 061. 1
10_90	ACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCA	1	<i>Apiscia</i>	4e-	AF4

	GTATTTAGCCTTGGACGGAATTTAC CGCCCGATTGGGGCTGCATTCCCAA ACAACCCGACTCGCCGACAGCGCCT CGTGGTGCACAGGGTCCGGGCACA ACGGGGCTCTCACCCTCTCTGGCGC CCCCTTCCAGGGGACTTGGGCCCGG TCCGCCACTGAGGACGCTTCTCCAG ACTACAATTCGAACGCCGAAGGCGA CCGATTCTCATGGTGGGCTTTTCCCG GTTGCTCGCCGTTACTAGGGGAAT CCTTGTTAGTTTCTTTTACCTGCCCCG GGCGGCCGCTCGATCCCGCCGTTTG TTTGCCGACCAGCAGTAGGGGGCCT TGGCCCCCAGAGGCACGTGCCGTT GGTGACCCTCGTAAGGTGAATCAGC CTTGCGAGACGCCTTGAAGCGCAAT TCCTATCGAGCGGCGGGTAGAATCC TTGCAGACGAATCAAAGCGACAAG GGCTGAATCTCAGTGGATCGTGGCA GCAAGGCCACTCTGCCCTTCA		<i>sinensis</i>	135	791 46.1
10_91	GTCACTGCGACCCCCCTTGTGAGGA GGCACCCCTTCTCCCGAAGTTACGG GGCTATTTTGCCGAGTTCCTTAGAG AGAGTTGTCTCGCGCCCCCTAGGTAT TCTCTACCTACCCACCTGTGTGCGTT TCGGGTACAGGTACCTCGGCCGCGA CCACGCT	1	<i>Coffea arabica</i>	2e-67	EF0 442 13.1
10_96	TGTTACCACAGGGATAACTGGCTTG TGGCAGCCAAGCGTTCATAGCGACG TTGCTTTTTGATCCTTCGATGTCCGC TCTTCTATCATTGTGAAGCAGAATT CACCAAGTGTTGGATTGTTACCCA CCAATAGGGAACGTGAGCTGGGGTT AGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTT TACCCTACTGATGACAGTGTCGCAA TAGTAATTCAACCTAGTACCTCGGC CGCGACCACGCT	1	<i>Viburnu m erosum</i>	8e- 109	JF3 211 30.1
10_97	GTGACCTGCTATTAACGTCCGGCTTA TCTGTCAGTCGCGTCCGGTCTGCCG CTCAGTTGAAAGCTATGAAACAAGT CTGCGGTAGTTTAAAACCTGGAATTG GCACAATATCGCGAAGTCGCCGCCT TTGCTCAATTTGGCTCAGACCTTGAT	1	<i>P.vulgari s</i>	1e-96	M64 246. 1

GCTGCGACTCAGGCATTACTCAATA
GAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTACC
TCGGCCGCGACCACGCT

¹Seqüência com menos de 85% homologia no Gen Bank

²Seqüência sem qualquer homologia no Gen Bank