

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

LEIRI DAIANE BARILI

**EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*
L.) SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS**

LAGES, SC

2011

LEIRI DAIANE BARILI

**EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*
L.) SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS**

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)

Barili, Leiri Daiane

Expressão gênica em genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)
submetidos ao estresse por baixas temperaturas / Leiri Daiane Barili ;
orientador: Jefferson Luís Meirelles Coimbra. – Lages, 2011.
67f.

Inclui referências.

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

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. Estresse abiótico . 3. Frio. 4. Expressão
gênica. I. Título.

CDD – 635.652

LEIRI DAIANE BARILI

EXPRESSÃO GÊNICA EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*

L.) SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS

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: _____ / _____ / _____

Homologada em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora:

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)

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

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

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

Lages, Santa Catarina, 15 de julho de 2011

Dedico

*Aos amores da minha vida
que sempre me apoiaram independente das minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção, saúde e inteligência as quais foram essenciais para alcançar todos os meus objetivos;

Aos meus pais fonte de tudo exemplo de carinho, honestidade e lealdade, por estarem ao meu lado independente das minhas escolhas;

Às minhas irmãs Márcia e Cristiane pelo amor, carinho e torcida pelo meu sucesso;

À pretinha pelo carinho, apoio e amizade nos momentos difíceis e por nunca ter deixado-me desistir nas barreiras do caminho;

Aos professores Jefferson L.M. Coimbra e Altamir F. Guidolin pela orientação, conhecimento transmitido, incentivo, amizade e confiança depositada para realização deste projeto;

Ao professor Marcelo L. Laia pela orientação, incentivo e dedicação mesmo estando longe;

Ao pesquisador Mauricio M. Kopp pela orientação, dedicação, incentivo, conhecimento transmitido incansável desde o início deste projeto;

Aos colegas do IMEGEM, Juliano, Toaldo, Patric, Fabiani, Joice, Carmelice, Bruna, Jussara, Gerson, Luciano e Diane pelo apoio no trabalho, descanso, desespero e nos momentos de festa e alegria;

Aos professores e amigos Jaqueline, Ediane, Carlos André e Adelar pela ajuda, atenção, conhecimento transmitido e disponibilidade em ajudar-me nos momentos difíceis;

Ao Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade do mestrado;

A Capes, Fapesc e CNPq pela concessão do apoio financeiro para realização deste trabalho bem como, pela bolsa de estudo,

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e que não tenham sido aqui mencionados gostaria que soubessem da minha gratidão.

Meu muito Obrigado.

RESUMO

BARILI, Leiri Daiane. **Expressão gênica em genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidos ao estresse por baixas temperaturas.** 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

O feijão tem grande importância no Brasil, sendo consumido em todos os Estados e cultivado praticamente em todos os meses do ano, o que condiciona uma diversidade de condições climáticas. No planalto catarinense o estresse por baixas temperaturas após a semeadura afeta negativamente a cultura, dificultando o arranque inicial das plantas. Assim, a identificação de genótipos portadores de genes que conferem a tolerância a este estresse é de grande valiosa para programas de melhoramento. Para tanto, a técnica de isolamento de genes numa determinada situação, a Hibridação Subtrativa Supressiva Seguida por PCR (SSH), pode auxiliar nesta identificação. Assim, este projeto teve como objetivos, submeter genótipos de feijão ao estresse por baixa temperatura, discriminá-los em tolerantes e sensíveis, e posteriormente estudar os genes diferencialmente expressos nos genótipos mais contrastantes por meio do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA. Inicialmente genótipos de feijão foram germinados sobre duas temperaturas, 10 °C e 25 °C, num delineamento experimental de blocos casualizados com três repetições. Em seguida foram avaliados o índice de velocidade de germinação, o comprimento da parte aérea e das raízes, a massa fresca da parte aérea e das raízes, e a massa seca da parte aérea e das raízes. Os dados foram submetidos a análise de variância seguida do teste de comparação de médias. Após a identificação do genótipo tolerante e sensível ao frio, foram realizadas as extrações de RNA total destes genótipos nas duas temperaturas de germinação, totalizando quatro amostras. Em seguida procedeu-se a SSH para isolar os genes de interesse. Os fragmentos obtidos foram clonados em vetor p-GEM e seqüenciados pelo método *Sanger*. Os resultados revelaram variabilidade quanto ao caráter tolerância ao frio entre os genótipos avaliados, quando submetidos ao estresse, sendo possível discriminá-los. O genótipo IAPAR 81 por apresentar comportamento superior aos demais genótipos foi classificado como tolerante, e o genótipo Pérola devido seu desempenho insatisfatório, como sensível ao frio. Após a SSH, foram observados fragmentos diferencialmente expressos no genótipo tolerante, bem como no sensível, porém em menor intensidade. O seqüenciamento dos clones da biblioteca de cDNA do genótipo IAPAR 81 revelou que 92,4% das seqüências apresentaram homologia com as já depositadas no banco de dados (Genbank), e para 7,6% das seqüências não foi encontrada homologia, podendo estas corresponderem a fragmentos de genes ainda não identificados e que podem estar intimamente relacionados a tolerância ao estresse por baixas temperaturas em feijão no período da germinação.

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

ABSTRACT

BARILI, Leiri Daiane. **Gene expression in genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to stress by low temperatures** 2011. 67 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 of the great importance in Brazil, and consumed in all states of the country. Its growing occur in virtually every month of the year, which affects a variety of weather conditions. In the Santa Catarina plateau, the stress by low temperatures in the period after sowing, affects drastically the crop, making the startup of the plant causing losses to farmers. When sowing in conditions of stress, the seeds of many genotypes deteriorate and do not develops a plant. However, seeds of other genotypes have the ability to produce uniform plants. This ability is due to a set of genes, which when subjected to an adverse environment, it expresses and confers tolerance to the plant, making the genotype that carriers these genes, a valuable source for breeding programs. The identification of these genotypes, as well as the mining of these genes that confer this phenotype, are essential for adaptation of the bean to cold regions. For this, a modern technique of isolation of genes expressed in a particular situation, the Suppressive Subtractive Hybridization Followed by PCR (SSH), can help in this search. Therefore, this project had the purpose of submitting bean genotypes for low temperature stress, break them into tolerant and sensitive, and then unravel the genes differentially expressed in contrasting genotypes by sequencing cDNA libraries. Initially bean genotypes were subjected to germination on the temperatures of 10 °C and 25 °C in a randomized block experimental design with three replications. They were then evaluated according to the index of the germination velocity, length of the aerial parts and the roots, fresh weight of the aerial parts and the roots, and dry mass of the aerial parts and the roots. Data were subjected to analysis of variance, followed by the comparison of means test. After the identification of genotypes tolerant and sensitive to cold, extraction of total RNA was performed with these genotypes, followed by SSH to isolate the genes of interest. These fragments were then cloned into specific vectors and sequenced by the Sanger method. The results revealed the presence of variability among genotypes when subjected to stress by low temperatures. It was possible to discriminate genotype IAPAR 81 as tolerant, considering that it showed results superior to the other genotypes. The Pérola genotype was considered as sensitive to cold. After the SSH technique, were found differentially expressed fragments in the tolerant genotype, as well as sensitive, but less intense. The sequencing of the cDNA library clones of the IAPAR 81 genotype, revealed that 92.4% of the sequences showed homology with those already deposited in the database (Genbank), and to 7.6% of the sequences, not homology was found, which may also correspond to genes not identified and that are closely related to stress tolerance by low temperatures in beans on germination period.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Abiotic stress. Cold. Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da hibridação aleatória das moléculas de cDNA após a primeira (<i>Tester + Driver</i>) e segunda (população 1 e 2 de <i>Tester + Driver</i>) hibridização subtrativa, com a formação de cinco diferentes tipos de moléculas de cDNA	38
Figura 2 -	Esquema representativo ilustrando a reação supressiva da PCR, na qual as diferentes moléculas formadas após a segunda hibridização apresentam diferentes caminhos.....	39
Figura 3 -	Qualidade do RNA total extraído com TRizol, revelado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado com luz UV.....	44
Figura 4 -	Gel de agarose dos produtos dos PCRs 1 e 2, das populações de cDNA obtido após a SSH. Na ordem, temos o peso molecular de 100 pb, 1 ⁰ e 2 ⁰ PCR do genótipo Pérola, seguida do 1 ⁰ e 2 ⁰ do genótipo IAPAR 81.....	46
Figura 5 -	Perfil eletroforético de DNA plasmidial isolado de clones contendo cDNA. A primeira canaleta corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb, e as demais canaletas a clones purificados.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise da variância para os oito genótipos de feijão submetidos a germinação nas temperaturas de 10 $^{\circ}\text{C}$ e 25 $^{\circ}\text{C}$, para os caracteres, comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes (CR), índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR)	21
Tabela 2 -	Média dos oito genótipos de feijão germinados nas temperaturas (Temp) de 10 $^{\circ}\text{C}$ e 25 $^{\circ}\text{C}$ para os caracteres: comprimento das raízes (CR) e da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), Índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR).....	23
Tabela 3 -	Estimativa da diferença entre as médias dos genótipos de feijão para germinados a 10 $^{\circ}\text{C}$ que apresentaram diferença significativa, para os caracteres comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), Índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca das raízes (MSR) e da parte aérea (MSPA).....	24
Tabela 4 -	Componentes utilizados na ligação dos adaptadores nas populações <i>Testers</i> de cDNA.....	36
Tabela 5 -	Montagem da primeira e segunda hibridização de cDNA <i>Tester</i> e <i>Driver</i> . Descrição dos componentes e quantidade (μL) utilizadas em cada reação.	37
Tabela 6 -	Componentes, quantidades (μL) e programa de ciclagem utilizados na primeira e segunda reação de amplificação.	40
Tabela 7 -	Relações espectrofotométricas das quatro amostras de RNA total extraído de folhas de feijão com TRIzol, submetidas a diferentes temperaturas.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	CAPÍTULO I: DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO EM RESPOSTA AO ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA.....	16
2.1	RESUMO	16
2.2	ABSTRACT	17
2.3	INTRODUÇÃO	17
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
2.6	CONCLUSÃO.....	27
3	CAPÍTULO II: MINERAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS	29
3.1	RESUMO	29
3.2	ABSTRACT	30
3.3	INTRODUÇÃO	30
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.6	CONCLUSÃO	49
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICES	57

1 INTRODUÇÃO GERAL

O atendimento a demanda crescente por alimentos em termos nacionais e mundiais depende da união de diferentes áreas do conhecimento, que apontam para uma agricultura associada à questões ambientais. O aumento na produtividade das culturas, só será possível se os programas de melhoramento genético das plantas voltarem sua atenção para as mudanças climáticas que o planeta vêem sofrendo. Juntamente com o objetivo de aumento no rendimento de grãos, o melhorista deve almejar cultivares tolerantes as mais diferentes condições de estresses que esta cultura será submetida. Entre os fatores ambientais importantes, as condições de temperatura do ar tem grande relevância, em virtude de que as previsões em relação a alteração térmica global são ainda incertas (IPCC, 2007).

A incerteza ou desconhecimento em relação às condições meteorológicas e da probabilidade de ocorrência de adversidades climáticas é constante a preocupação dos setores primários de produção. No feijão esta preocupação também é permanente, pois é uma cultura de grande importância econômica e social para o Brasil, por fazer parte do prato principal da grande maioria da população, e é freqüentemente submetida a condições de estresse, pois é cultivada em todo território nacional.

O feijão é uma planta diplóide com adaptação a climas quentes e amenos, numa faixa térmica de 18 a 30 °C (VIEIRA et al., 1999), no entanto, é pouco tolerante a fatores extremos do ambiente, sendo relativamente exigente as condições climáticas (Embrapa, 2005). A produção do feijão é variável entre os anos e isto provoca perturbações e inconstância no cenário comercial (DOURADO e FANCELLI, 2000). Esta oscilação no rendimento de grãos, muitas vezes devido ao desconhecimento das condições meteorológicas ao longo do período produtivo da cultura. Por ser uma cultura intolerante a temperaturas menores que 15 °C e à geada, o frio é um fator limitante a cultura, provocando injurias que afetam drasticamente seu potencial produtivo.

No período da germinação, o estresse por baixas temperaturas provoca redução na porcentagem de sementes germinadas e desenvolvimento retardado das plantas (MARIOT, 2000), estendendo este prejuízo ao longo do ciclo produtivo. Existe uma forte relação entre a taxa de germinação e a taxa de crescimento, ou seja, plantas que

apresentam germinação lenta, provavelmente apresentarão crescimento retardado (CUSTÓDIO et al., 2009). Tais ocorrências geram preocupações e desestimulam os produtores de feijão, em especial os da região do Planalto Catarinense, no Estado de Santa Catarina, onde as baixas temperaturas no período pós-semeadura do feijão, apresentadas pela primavera gelada desta região, acarretam enormes prejuízos.

Neste contexto, há um grande desafio, reinserir na cadeia produtiva do feijão, produtores que abandonaram o cultivo devido aos prejuízos enfrentados, bem como incentivar novos agricultores a cultivar este alimento de notável importância nacional e mundial. Alicerçado nas conquistas do passado, o melhoramento genético de plantas é uma ciência que muito tem a contribuir para esta conquista, avaliando, selecionando e adaptando plantas aos cenários da agricultura (RAMALHO et al., 2009) e desenvolvendo cultivares tolerantes aos estresses bióticos e abióticos.

O melhoramento de plantas, ciência de expressiva relevância para a agricultura e para a sociedade no Brasil e no mundo, proporcionou aumentos na produtividade das culturas, plantas mais resistentes a pragas e doenças, bem como, permitiu o cultivo de espécies em regiões onde naturalmente sua produção seria impraticável. E hoje, para enfrentar estes desafios, os melhoristas de plantas contam com modernas ferramentas da biotecnologia. Assim, tornaram-se possíveis os estudos moleculares e a descoberta de como ocorrem os eventos que as plantas disparam com a percepção do estresse, levando a expressão dos genes que as permitem sobreviver a esta situação adversa (CUSTÓDIO et al., 2009). Tais ferramentas associadas aos métodos convencionais de melhoramento de plantas poderão torná-los mais eficientes. Bem como, a descoberta de genes envolvidos na tolerância ao frio em feijão na germinação, pode auxiliar a identificação de marcadores moleculares ligados a tolerância e proporcionar a possibilidade da seleção assistida de indivíduos. O uso destes marcadores pode simplificar e acelerar a seleção de plantas tolerantes em população segregante (ALVES et al., 2005).

A adaptação da cultura do milho de origem tropical a regiões de clima temperado, com a seleção de indivíduos ou progêneres tolerantes a menores temperaturas (TROYER, 2004), é um exemplo de grande relevância, e que permite acreditar que o desafio proposto pode ser alcançado. O desenvolvimento de genótipos de feijão adaptados a região do Planalto Catarinense e tolerantes as baixas temperaturas poderá mitigar os problemas ocasionados por este estresse, reduzindo os danos econômicos enfrentado pelos agricultores, bem como, alavancar a produção de feijão nesta região.

Neste sentido, este trabalho baseou-se nos seguintes pressupostos: *i*) que há variabilidade entre genótipos de feijão para o caráter tolerância ao estresse por baixas temperaturas no período da germinação; *ii*) que esta variabilidade se deve a determinados genes que são expressos nos genótipos tolerantes após a indução do estresse; Com base no pressupostos o objetivo deste trabalho foi: *i*) submeter genótipos de feijão ao estresse por baixas temperaturas e discriminá-los em tolerantes e sensíveis ao estresse; *ii*) identificar fragmentos de genes diferencialmente expressos nos genótipos contrastantes utilizando a Hibridização subtrativa supressiva seguida por PCR.

2 CAPÍTULO I: DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO EM RESPOSTA AO ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA NO PERÍODO DA GERMINAÇÃO

2.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de genótipos de feijão submetidos ao estresse por baixa temperatura e classificá-los em tolerantes ou sensíveis para que sejam utilizados em estudos de melhoramento vegetal e genética molecular. Oito genótipos de feijão foram submetidos à germinação sobre duas condições de temperatura (10°C e 25°C). As características avaliadas foram: *i*) índice de velocidade de germinação; *ii*) comprimento da parte aérea; *iii*) comprimento das raízes; *iv*) massa fresca da parte aérea; *v*) massa fresca das raízes; *vi*) massa seca da parte aérea e *vii*) massa seca das raízes. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com três repetições. O genótipo IAPAR 81 apresentou comportamento superior para todas as características estudadas, evidenciando possuir mecanismos de tolerância ao estresse de 10°C . O genótipo Pérola foi o mais afetado pelo frio obtendo menor desempenho para todos os caracteres avaliados sendo caracterizado como sensível.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Estresse Abiótico. Frio. Germinação.

2.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the performance of genotypes beans subjected to stress by low temperature and classify them into tolerant or sensitive to be used in the study of plant breeding and molecular genetics. Eight genotypes were germinated on two temperature conditions (10 °C and 25 °C). The characteristics evaluated were: *i*) germination speed; *ii*) shoot length; *iii*) root length; *iv*) fresh weight of shoot; *v*) fresh weight of the roots; *vi*) shoot dry mass and *vii*) root dry mass. The experimental design was split design with three replications. IAPAR 81 genotype showed the best performance for all traits studied, showing possess mechanisms of 10 °C stress tolerance. The Pérola genotype was the most affected by the cold getting lower performance for all traits being characterized as sensitive.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Abiotic Stress. Cold. Germination.

2.3 INTRODUÇÃO

O cultivo do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é realizado em praticamente todos os estados brasileiros e em todos os meses do ano, acarretando em uma dezena de cenários aos quais a cultura é submetida. Na maioria delas regiões, as necessidades hídricas, térmicas e nutricionais não são atendidas, reduzindo de forma negativa e significativa o seu rendimento. A produtividade média nacional do feijão no ano de 2010 foi de 842 kg ha⁻¹, já em Santa Catarina de 1.383 Kg ha⁻¹ (CONAB, 2010), no entanto ambas as produtividades estão abaixo do potencial produtivo da cultura do feijão que chega a 4.000 kg ha⁻¹ (BORÉM, 2005).

As principais causas do baixo rendimento de grão na cultura do feijão são os estresses abióticos, pois influenciam negativamente as planta, afetando nas diferentes fases do desenvolvimento. As condições ideais de temperatura do ar para o desenvolvimento da cultura são na faixa de 20 a 22 °C (Embrapa, 2003). No Sul do país em especial na região do Planalto Catarinense esta exigência não é satisfeita, pois é freqüente a ocorrência de baixas temperaturas nos meses de outubro e novembro, período em que a cultura do feijão é semeada. Este fato é um entrave para a semeadura, principalmente para cultivares de ciclo longo que necessitam serem semeadas no inicio

de outubro. A identificação e desenvolvimento de genótipos tolerantes a baixa temperatura na germinação são importantes para o cultivo nesta região catarinense.

O frio e a seca são prejudiciais à cultura do feijão afetando todo seu desenvolvimento culminando na redução na sua produtividade (GROVER et al., 2001). As baixas temperaturas no estádio da germinação causam injúrias e desordem fisiológica, atrasando e diminuindo a porcentagem de plantas germinadas (MARTINS et al., 2007) afetando o arranque inicial das plântulas e estande da lavoura. Temperaturas próximas a 10 °C após a semeadura não permitem a germinação das sementes de feijão, e quanto maior o tempo de exposição da semente ao estresse maior sua taxa de deterioração (BINOTTI et al., 2008). Dentre os mecanismos fisiológicos responsáveis pelos danos de frio, tem-se o impedimento do funcionamento da membrana celular e de organelas (LYONS, 1973), a inibição da fotossíntese devida à foto-oxidação da clorofila nos cloroplastos (TAJIMA, 1995) e o estresse oxidativo. E uma alternativa para reduzir estes prejuízos é utilizar genótipos tolerantes ao estresse (STEINER et al. 2010).

Debates alarmantes sobre as consequências das mudanças climáticas na agricultura estão sendo realizados em todo mundo nas diferentes áreas do conhecimento (RAMALHO et al., 2009), bem como, as previsões sobre as alterações na temperatura global são ainda incertas (IPCC, 2007). Como no passado, o melhoramento genético de plantas participará efetivamente na adaptação das culturas ao novo cenário da agricultura, contribuindo na produção de alimentos e de energia nas próximas décadas (RAMALHO et al., 2009). Como exemplo, temos a adaptação da cultura do milho de origem tropical às condições temperadas, por meio da seleção de indivíduos adaptados e tolerantes as baixas temperaturas (TROYER, 2004).

Da mesma forma, o estudo de genótipos de feijão em relação a tolerância ao estresse por baixas temperaturas, é de grande importância em programas de melhoramento. Estes trabalhos podem incrementar os blocos de cruzamento com fontes de tolerância, auxiliando o desenvolvimento de cultivares produtivas e adaptadas às condições de baixa temperatura nas fases iniciais da planta, possibilitando antecipar a época de semeadura (MERTZ et al., 2009). Tais estudos também fornecem subsídios para trabalhos moleculares, que devido seu alto custo, requerem informações prévias dos genótipos para viabilizar sua execução.

Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de genótipos de feijão submetidos ao estresse por baixa temperatura e identificar os contrastantes para subsidiar estudos de melhoramento vegetal e genética molecular.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito genótipos de feijão registrados no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, sendo, IAPAR 14, IAPAR 81, Pérola, IPR Colibri, IPR Chopim, IPR Gralha, IPR Tiziu e IPR Uirapuru, os quais foram obtidos junto a seus detentores (Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa) para garantir pureza varietal.

Os genótipos foram submetidos à germinação sobre duas condições de temperatura. Na condição T1 (condição de estresse), a temperatura foi de 10 °C e na condição T2 (condição ideal), a temperatura foi mantida entre 22 °C e 25 °C. As condições T1 e T2 foram simuladas utilizando câmara de crescimento, onde a umidade relativa foi mantida em 75%. A semeadura foi realizada em vasos plásticos número 01 (dimensões: 19,0; 13,0 e 16,0 cm), contendo 250 g de substrato Plantmax, com cinco sementes por vaso, dispostas equidistantemente na profundidade de cinco centímetros.

Na condição T1 os genótipos permaneceram na câmara de crescimento até que um dos baldes apresentasse cinco sementes germinadas com os cotilédones acima do solo, ou seja, 100% da possibilidade de germinação por balde. Este período correspondeu a 21 dias, partindo da semeadura, onde então, as avaliações foram realizadas em todos os genótipos. Na condição T2 os genótipos foram avaliados ao sétimo dia de acordo com proposto por Brasil (2009) para sementes de feijão.

As características avaliadas foram: *i*) índice de velocidade de germinação, *ii*) comprimento da parte aérea (cm), *iii*) comprimento das raízes (cm), *iv*) massa fresca da parte aérea (g), *v*) massa fresca das raízes (g), *vi*) massa seca da parte aérea (g) e *vii*) massa seca das raízes (g).

O Índice de velocidade de germinação (IVG) foi estimado conforme a metodologia proposta por Maguirre (1962), onde são contabilizadas diariamente as sementes germinadas com os cotilédones acima do solo, utilizando a seguinte equação:

$$IVG = \frac{G_1}{T_1} + \frac{G_2}{T_2} + \dots + \frac{G_i}{T_i}$$

Onde: IVG é índice de velocidade de germinação;

G_1 até G_i é o número de plantas germinadas a cada dia;

T_1 até T_i é o tempo em dias.

O comprimento da parte aérea foi obtido medindo desde a zona de diferenciação entre raiz/parte aérea até os cotilédones. O comprimento das raízes foi

verificado medindo o comprimento da raiz primária. Ambas as características foram mensuradas utilizando-se régua com graduação em milímetros. Os dados de massa fresca e massa seca da parte aérea e das raízes foram obtidos individualmente. A massa fresca foi medida no momento da avaliação do experimento, já o valor de massa seca foi obtido após as amostras permanecerem em estufa com circulação de ar por 24 h na temperatura de 62 °C (BRASIL, 2009). As pesagens foram realizadas utilizando balança digital com precisão de 0,001 g.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com três repetições. O modelo estatístico utilizado neste experimento foi:

$$Y_{ijk} = m + b_i + g_j + t_k + gt_{jk} + e_{ijk}$$

Efeitos expressos na equação do modelo estatístico: m : média; b_i : bloco; g_j : genótipo; t_k : temperatura; gt_{jk} : interação entre o genótipo j na temperatura k ; e e_{ijk} : erro experimental.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro e posterior teste de comparação múltipla de médias (Tukey), a fim caracterizá-los como tolerantes e sensíveis a temperatura de 10 °C. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS 9.1.3 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2002).

O experimento descrito acima foi realizado por três vezes consecutivas, onde na primeira delas, a condição de estresse foi de 5 °C, no entanto não foi possível a obtenção de resultados visto que, as sementes apresentaram deterioração próximo ao décimo quinto dia após a semeadura. Na segunda realização, o aparelho onde o experimento estava sendo conduzido, apresentou defeito, sendo então o experimento descartado. E na terceira vez, o experimento foi concluído e gerou os dados aqui apresentados.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados inseridos na Tabela 1 são referentes a análise de variância para os oito genótipos de feijão estudados, os quais foram submetidos a germinação nas temperaturas de 25 °C e 10 °C. Analisando os resultados é possível verificar que a interação genótipo \times temperatura apresentou efeito significativo para todos os caracteres

estudados a 5% de probabilidade de erro, exceto para a característica massa seca da parte aérea (MSPA), porém se verifica que ambos os fatores, temperatura e genótipo apresentaram efeito significativo para esta característica.

O efeito significativo da interação entre genótipo *x* temperatura demonstra que estes genótipos comportam-se de maneira diferenciada frente as temperaturas testadas. Este fato evidenciou que o decréscimo de um determinado genótipo, quando estressado, comportou-se diferentemente para uma determinada característica entre os genótipos estudados. Atenção especial deve ser dada aos caracteres CR, CPA, IVG, massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR), pois para todos os fatores testados, apresentaram efeito significativo apontando serem bons indicadores para a distinção de genótipos sensíveis e tolerantes a temperaturas abaixo do ideal.

Tabela 1- Análise da variância para os oito genótipos de feijão submetidos a germinação nas temperaturas de 10 °C e 25 °C, para os caracteres, comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes (CR), índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR).

FV	GL	Quadrado Médio						
		CPA	CR	IVG	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Temp (T)	1	2182,22*	1612,40*	8,79*	8,64*	0,15*	0,09*	0,01
Gen (G)	7	46,33*	45,96*	0,18*	0,31*	0,35*	0,02*	0,03*
T x G	7	19,84*	60,07*	0,10*	0,10*	0,16*	0,01	0,04*
Bloco	2	79,15*	98,07*	0,03	0,58*	0,16*	0,02*	0,01
C.V. (%)	-	24,25	27,09	29,39	27,11	35,24	30,11	35,46
Resíduo	-	7,82	13,13	0,02	0,03	0,04	0,01	0,01

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

Estudos vêm sendo realizados em diferentes culturas a fim de avaliar o efeito das baixas temperaturas sobre as características morfológicas e fisiológicas de distintos genótipos, e identificar os tolerantes ao frio como, por exemplo, nas leguminosas, amendoim forrageiro (BRESOLIN et al., 2008), feijão (FERRÃO et al., 2001) e em gramíneas como arroz (MARTINS et al., 2007), capim elefante (DALL'AGNOL et al., 2005), entre outras. Em todos estes estudos foi encontrado diferença significativa entre os genótipos estudados em relação as temperaturas testadas, bem como o efeito significativo destas sobre a manifestação dos caracteres avaliados, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Quando a interação entre os fatores é significativa ($G \times T$), o procedimento adequado é a decomposição dos graus de liberdade dessa interação, podendo desta forma, avaliar o efeito de um fator dentro dos níveis do outro fator (BERTOLDO et al., 2008). Tal procedimento foi efetuado através de contrastes (genótipo em temperatura (T) a 10°C x genótipo em temperatura (T) a 25°C) para todos os genótipos, os quais apresentaram contrastes significativos, ou seja, todos os genótipos, para todas as características avaliadas modificaram seu comportamento quando submetidos a germinação de 10°C , podendo esta diferença ser verificada na Tabela 2 onde estão apresentadas as médias nas duas condições testadas.

Não possibilitando por meio dos contrastes a identificação dos genótipos tolerantes, foi realizado o teste de comparação de médias, a fim de analisar o desempenho individual de cada genótipo e a sua dissimilaridade em relação aos demais, para então caracterizá-los em tolerantes ou sensíveis ao estresse por baixa temperatura. As médias dos genótipos para as sete características (Tabela 2) podem ser analisadas conjuntamente com as estimativas da diferença entre as médias dos genótipos par a par (Tabela 3), obtidas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade de erro.

Verifica-se que para a característica comprimento das raízes (Tabela 2), todos os genótipos apresentaram redução no seu comportamento quando comparado seu desempenho na condição T2 (25°C) com a T1 (10°C). Cabe salientar que os genótipos IPR Uirapuru e IAPAR 81 os quais apresentaram os melhores desempenhos em T2 (19,54 e 17,73 cm respectivamente) também foram os melhores em T1 (12,87 e 13,43 cm respectivamente) evidenciando sua superioridade quando submetidos as baixas temperaturas. Em contrapartida, sensibilidade ao frio foi demonstrada pelos genótipos Pérola e IPR Gralha, os quais a 25°C apresentaram elevado valor de CR (16,98 e 16,26 cm respectivamente), já, quando estressados reduziram drasticamente seus desempenhos apresentando os menores valores de CR a 10°C (6,18 e 6,56 cm respectivamente).

Verifica-se que os genótipos IPR Uirapuru e IAPAR 81 não diferem estatisticamente entre si para esta característica (Tabela 3), no entanto sua superioridade frente aos genótipos de desempenho inferior, Pérola e IPR Gralha são comprovadas pela diferença significativa entre suas médias.

Tabela 2. Média dos oito genótipos de feijão germinados nas temperaturas (Temp) de 10 °C e 25 °C para os caracteres: comprimento das raízes (CR) e da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), Índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR).

Caracteres	Temp	Genótipos							
		IAPAR 81	IPR Tiziú	IPR Chopim	IAPAR 14	IPR Uirapuru	IPR Colibri	IPR Gralha	Pérola
CR (cm)	25	17,73	15,86	16,66	15,62	19,54	16,87	16,26	16,98
	10	13,43	10,28	9,58	9,54	12,87	9,75	6,56	6,18
CPA (cm)	25	18,48	12,62	14,06	16,48	13,53	16,44	14,22	16,07
	10	9,56	7,32	9,38	5,78	5,76	5,95	5,33	5,03
MFPA (g)	25	1,12	0,82	0,83	0,86	0,73	1,00	0,68	1,02
	10	0,60	0,41	0,40	0,36	0,39	0,36	0,25	0,23
MFR (g)	25	0,93	0,67	0,72	0,62	0,96	0,68	0,63	0,71
	10	0,88	0,55	0,52	0,46	0,60	0,46	0,31	0,22
IVG	25	1,00	0,74	0,52	0,67	0,72	0,93	0,70	0,60
	10	0,35	0,31	0,26	0,24	0,32	0,25	0,17	0,15
MSPA (g)	25	0,35	0,24	0,25	0,27	0,21	0,30	0,20	0,30
	10	0,14	0,09	0,09	0,06	0,04	0,05	0,04	0,02
MSR (g)	25	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
	10	0,09	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,03	0,01

Da mesma forma que para CR, para a característica comprimento da parte aérea (Tabela 2), todos os genótipos apresentaram grande redução no seu comportamento, no entanto os genótipos IAPAR 81 e IPR Chopim, mesmo sobre condições adversas de temperatura apresentaram potencial de crescimento da parte aérea, atingindo os maiores valores de CPA, de 9,56 cm e 9,38 cm, respectivamente, fato este que não ocorreu com os genótipos Pérola (5,03 cm) e IPR Gralha (5,33 cm) os quais apresentaram os menores desempenhos. Os genótipos IPR Chopim e IAPAR 81 não diferem estatisticamente (Tabela 3) entre si para CPA, em contrapartida apresentam diferença significativa com os genótipos de desempenho inferior Pérola e IPR Gralha.

Tabela 3. Estimativa da diferença entre as médias dos genótipos de feijão par a par germinados a 10°C que apresentaram diferença significativa, para os caracteres comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR), Índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca das raízes (MSR) e da parte aérea (MSPA).

Genótipo i	X	Genótipo j	Características						
			CPA	CR	MFPA	MFR	IVG	MSR	MSPA
IPR Chopim	X	IPR Colibri	3,66*	-	-	-	-	-	-
IPR Chopim	X	IPR Gralha	4,02*	-	-	-	-	-	-
IPR Chopim	X	IAPAR 14	3,57*	-	-	-	-	-	-
IPR Chopim	X	IAPAR 81	-	-3,85*	-0,20*	-0,35*	-	-0,04*	-
IPR Chopim	X	Pérola	4,77*	-	-	0,31*	-	0,04*	0,07*
IPR Chopim	X	IPR Tiziu	-	-	-	-	-	-	-
IPR Chopim	X	IPR Uirapuru	3,60*	-	-	-	-	-	-
IPR Colibri	X	IPR Gralha	-	-	-	-	-	-	-
IPR Colibri	X	IAPAR 14	-	-	-	-	-	-	-
IPR Colibri	X	IAPAR 81	-3,86*	-3,68*	-0,24*	-0,44*	-	-0,05*	-0,09*
IPR Colibri	X	Pérola	-	3,70*	-	0,21*	-	-	-
IPR Colibri	X	IPR Tiziu	-	-	-	-	-	-	-
IPR Colibri	X	IPR Uirapuru	-	-	-	-	-	-	-
IPR Gralha	X	IAPAR 14	-	-	-	-	-	-	-
IPR Gralha	X	IAPAR 81	-4,23*	-6,88*	-0,36*	-0,56*	-0,17*	-0,06*	0,10*
IPR Gralha	X	Pérola	-	-	-	-	-	-	-
IPR Gralha	X	IPR Tiziu	-	-3,73*	-0,17*	-0,23*	-	-	-
IPR Gralha	X	IPR Uirapuru	-	-6,32*	-	-0,27*	-0,14*	-	-
IAPAR 14	X	IAPAR 81	-3,77*	-3,89*	-0,24*	-0,42*	-	-0,04*	-0,08*
IAPAR 14	X	Pérola	-	3,57*	-	0,24*	-	0,04*	-
IAPAR 14	X	IPR Tiziu	-	-	-	-	-	-	-
IAPAR 14	X	IPR Uirapuru	-	-3,33*	-	-	-	-	-
IAPAR 81	X	Pérola	4,97*	7,46*	0,39*	0,65*	0,19*	0,08*	0,12*
IAPAR 81	X	IPR Tiziu	-	3,15*	0,19*	0,33*	-	0,04*	-
IAPAR 81	X	IPR Uirapuru	3,80*	-	0,23*	0,28*	-	-	0,10*
Pérola	X	IPR Tiziu	-	-4,31*	-0,20*	-0,33*	-0,15*	-0,04*	-0,07*
Pérola	X	IPR Uirapuru	-	-6,90*	-0,16*	-0,37*	-0,17*	-0,05*	-
IPR Tiziu	X	IPR Uirapuru	-	-	-	-	-	-	-

* Estimativas diferem significativamente a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey-Kramer.

- Estimas sem diferença significativa a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey-Kramer.

O desenvolvimento da raiz é fundamental para implantação de qualquer cultura. No feijão, ela é a primeira estrutura que se desenvolve, e sua boa expansão e comprimento são desejáveis para aumentar a área de exploração das raízes no solo e melhorar a fixação da planta. Após o desenvolvimento da raiz ocorre o crescimento do hipocótilo e em seguida sua diferenciação em parte aérea, a qual está diretamente relacionada a habilidade do genótipo em germinar sobre condições adversas visto que, a capacidade em elongação da parte aérea está relacionada a fatores como a competição pela radiação solar, onde a suscetibilidade dos genótipos às baixas temperaturas, causam sérios danos no estabelecimento da lavoura, diminuindo o estande inicial e favorecendo o crescimento de plantas daninhas (CRUZ e MILACH, 2004).

Desta forma, as características supracitadas são de grande importância a serem consideradas na discriminação dos genótipos tolerantes às baixas temperaturas, pois, os que apresentarem bom desenvolvimento, podem ser considerados como genótipos potenciais e que possuem habilidades de tolerar este estresse e sobreviver, como é o caso do IAPAR 81, que apresentou o melhor desempenho para ambas. Sob baixas temperaturas, pode ocorrer redução do crescimento das plântulas e esse prejuízo, geralmente, é proporcional ao período de exposição a essa determinada temperatura, podendo se estender o problema durante todo período de desenvolvimento da cultura (MARCOS FILHO, 2005). Sendo assim, verifica-se que IAPAR 81 é um genótipo potencial a ser utilizado em regiões onde a ocorrência de baixas temperaturas é comum, nos meses em que a semeadura do feijão é realizada.

Outra característica de grande relevância é o índice de velocidade de germinação (IVG) o qual combina a avaliação da velocidade de germinação com a uniformidade da emergência das plântulas, demonstrando que, os genótipos que apresentarem os maiores valores quando em condição de estresse, são os que tiveram rápida e uniforme germinação e emergência e desta forma podem ser considerados como tolerantes ao frio (MARCOS FILHO, 2005).

Delouche (2004) considera que as baixas temperaturas são o fator de maior influência sobre a velocidade, porcentagem de germinação e emergência de plântulas, sendo importante estudar e explorar a variabilidade genética existente entre genótipos (SILVA, 2008), e, a partir da identificação de genótipos tolerantes a baixa temperatura, utilizá-los como fontes de genes em blocos de cruzamento de programas de melhoramento de plantas.

Desta maneira, pode ser observado na Tabela 2, que os genótipos IAPAR 81 e IPR Uirapuru apresentaram os maiores valores de IVG (0,35 e 0,32 respectivamente) em relação aos demais genótipos quando estressados, bem como, não diferiram significativamente entre si (Tabela 3), indicando que possuem mecanismos capazes de tolerar a baixa temperatura e germinar nesta condição adversa. No entanto IAPAR 81 e IPR Uirapuru diferiram estatisticamente dos genótipos Pérola e IPR Gralha os quais se mostraram sensíveis a temperatura de 10 $^{\circ}$ C, pois apresentaram os menores valores de IVG (0,15 e 0,17 respectivamente).

A redução gradativa da temperatura afeta a velocidade de embebição e mobilização de reservas, provocando decréscimo na velocidade de germinação, contribuindo para maior sensibilidade da semente aos fatores adversos do ambiente, especialmente a associação com microorganismos, e consequentemente maior dificuldade no estabelecimento das plântulas no campo (MARCOS FILHO, 2005).

Certos genótipos possuem mecanismos que lhes confere maior rapidez na emergência, conferindo a eles vantagens no crescimento inicial da parte aérea e do sistema radicular, e este fato pode ser comprovado, analisando conjuntamente estas características na Tabela 2, onde os genótipos que apresentaram o melhor e o pior desempenho para CPA e CR foram os mesmos que apresentaram o maior e o menor valor de IVG sendo eles IAPAR 81 e Pérola respectivamente.

Em estudos com a cultura da soja, Castro et al., (2008) verificaram que as características massa fresca e seca das raízes estão diretamente relacionadas ao comprimento das mesmas, bem como o tamanho da parte aérea com sua massa fresca e seca. Também no feijão tal fato pode ser corroborado, pois os genótipos que apresentaram desempenho superior e inferior para CPA e CR foram os mesmos que apresentaram para MFPA e MFR. Ou seja, em relação aos caracteres massa fresca da parte aérea e massa fresca das raízes (Tabela 2) o genótipo IAPAR 81 apresentou superioridade, obtendo as maiores médias para ambos os caracteres (0,60 e 0,88 g respectivamente), bem como, apresentou diferença significativa de todos os genótipos (Tabela 3), até mesmo dos que atingiram a segunda melhor média para as duas características sendo eles, IPR Tiziu para MFPA (0,40 g) e IPR Chopim para MFR (0,60 g). O genótipo Pérola manteve seu comportamento inferior também para MFPA e MFR, apresentando os piores resultados para as ambas (0,23 g para MFPA e 0,22 g para MFR), bem como, diferiu significativamente do genótipo elite IAPAR 81.

Por fim, para os caracteres MSPA e MSR, verifica-se que o genótipo IAPAR 81 apresentou o mesmo comportamento dos caracteres supracitados, apresentando os maiores resultados (0,14 g para MSPA e 0,09 g para MSR), quando comparado aos demais genótipos (Tabela 2). Em relação a MSPA, IAPAR 81 obteve diferença significativa de todos os genótipos (Tabela 3), exceto do IPR Tizi e IPR Chopim (0,09 g para ambos). Para MSR, IAPAR 81 diferiu de forma significativa de todos os demais sete genótipos estudados. Em contrapartida o genótipo Pérola apresentou valores muito menores para estas características (0,02 g para MSPA e 0,01 g para MSR) e não diferindo apenas do genótipo IPR Gralha para MSR (Tabela 3). Santos et al. (2009) estudando soluções salinas em feijão afirmam que as características MSPA e MSR, são de suma importância a serem observadas e avaliadas quando o objetivo do estudo é identificar genótipos tolerantes a estresses.

A superioridade de certos genótipos é de grande relevância, pois sua capacidade da tolerância em condições de estresses demonstra que quando semeados em condições adversas de temperatura irão reagir e obter bom desenvolvimento. A adaptação das plantas a um ambiente desfavorável é baseado na necessidade de sua sobrevivência (NETO, 2004). E a expressão de genes desencadeada pela condição de estresse é o fator que possibilita a estes genótipos a tolerância, ao contrário dos sensíveis que apresentam grande redução quando germinados sob baixas temperaturas.

A tolerância ao frio é a capacidade que certas cultivares apresentam em suportar a ocorrência de baixas temperaturas, sem redução importante no seu rendimento e manifesta-se nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura do feijão, sendo a germinação uma das mais importantes. Verifica-se que determinados genótipos ora apresentam valores superiores, ora inferiores, no entanto o genótipo IAPAR 81 em todas as características estudadas mostrou-se superior, com excelentes médias evidenciando assim sua capacidade de tolerar o frio, ao contrário dos genótipos Pérola e IPR Gralha que apresentaram sensibilidade a temperatura de 10 °C.

2.6 CONCLUSÃO

Existe variabilidade entre os genótipos testados quanto a capacidade de tolerar a baixa temperatura no período da germinação.

O genótipo IAPAR 81 apresenta mecanismos que lhe conferem tolerância a temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}$ na fase da germinação, pois apresentou superioridade em todos os caracteres testados.

Em contrapartida, os genótipos Pérola e IPR Gralha foram os mais afetados pela baixa temperatura sendo caracterizados como os mais sensíveis.

3 CAPÍTULO II: MINERAÇÃO DE GENES EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO INDUZIDOS PELO ESTRESSE A BAIXAS TEMPERATURAS

3.1 RESUMO

O feijão é uma cultura altamente influenciada pelas condições ambientais, sendo a temperatura do ar um dos fatores que mais afeta seu desempenho. Quando submetido ao estresse por temperaturas abaixo do ideal no período após a semeadura, ele apresenta sérios prejuízos, principalmente quando são utilizados genótipos sensíveis ao frio. A utilização de genótipos tolerantes ameniza os danos, pois possuem genes que lhes confere capacidade de superar esta situação adversa. A identificação dos genes que controlam a tolerância ao frio em feijão é de grande interesse aos programas de melhoramento, e a técnica da hibridação subtrativa supressiva (SSH) é uma poderosa ferramenta da biologia molecular que auxilia nesta busca. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar e identificar genes diferencialmente expressos em genótipos de feijão após a indução do estresse por baixas temperaturas no período da germinação. Identificados os genótipos sensível e tolerante, procedeu-se o estudo da expressão gênica utilizando a SSH, seguido da construção e seqüenciamento da biblioteca de cDNAs diferencialmente expressos na condição de estresse. Foi possível verificar ao término da SSH que tanto o genótipo tolerante IAPAR 81 quanto o sensível Pérola, apresentaram fragmentos diferencialmente expressos, revelando que ambos possuem expressão diferencial quando submetidos ao estresse. A maior quantidade de fragmentos no IAPAR 81 indica que ele expressa genes que o Pérola, devido a sua sensibilidade ao frio, não expressa. O seqüenciamento da biblioteca de cDNA do IAPAR 81 revelou que 7,8% das seqüências obtidas não possuem homologia com as já depositadas nos banco de dados (Genbank), indicando que podem estar relacionadas aos genes que conferem a tolerância ao IAPAR 81 às baixas temperaturas no período da germinação.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Estresse abiótico, Hibridização subtrativa supressiva.

3.2 ABSTRACT

The crop bean is heavily influenced by environmental conditions, and the air temperature is the factor that most affects its performance. When subjected to stress by temperature below of the ideal in the period after sowing, its presents serious damage, especially when used cold-sensitive genotypes. The use of tolerant genotypes mitigates the damage, because it has genes that confer ability to overcome this adverse situation. The identification of genes that control cold tolerance in beans is of great value to the improvement programs, and suppressive subtractive hybridization technique (SSH) is a powerful tool of molecular biology that helps in this search. Thus, the aim of this work was study and identify differentially expressed genes in bean genotypes after the induction of low temperature stress during the germination period. After identified in sensitive and tolerant, the genotypes were conducted to the study of gene expression using the SSH technique, followed by construction and sequencing of the library of differentially expressed cDNAs in the stress condition. It was possible to check at the end of the SSH technique that both genotypes, the tolerant IAPAR 81 and sensitive Pérola, showed fragments differentially expressed, revealing that both have differential expression when subjected to stress. The largest amount of fragments in the IAPAR 81, indicates that it expresses genes that Pérola, due to its sensitivity to cold, do not expresses. The sequencing of the IAPAR 81 cDNA library revealed that 7.8% of the sequences obtained have no homology with those already deposited in the database (Genbank), indicating that it may be related to the genes that confer tolerance to low temperatures in the IAPAR 81 genotype in period of germination.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Abiotic Stress, Suppressive Subtractive Hybridization.

3.3 INTRODUÇÃO

A cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) possui grande importância econômica e social, sendo amplamente cultivada no território brasileiro, cujo desempenho é altamente influenciado pelas condições de ambiente (COIMBRA et al., 2009). É uma espécie adaptada a climas quentes, numa faixa térmica de 22 °C a 25 °C,

sendo a temperatura do ar um dos elementos climáticos de maior importância para esta cultura (Embrapa, 2003).

A planta de feijão é intolerante a temperaturas menores que 15 °C (BÖHMER et al., 2008), pois temperaturas baixas provocam prejuízos substanciais a cultura, em diferentes fases de seu desenvolvimento, indo desde, a redução na velocidade de embebição das sementes e mobilização de reservas (MARCOS FILHO, 2005), o que reduz a germinação, até a acentuada abscisão de flores, esterilidade dos grãos de pólen, distorção de tubo polínico e aborto de óvulos que culmina na queda do rendimento.

Nas últimas décadas os melhoristas têm buscado, selecionar e adaptar as plantas as condições subótimas de temperatura (FERRÃO et al., 2006), bem como, estudar os mecanismos genéticos envolvidos nesta adaptação. Quando submetidas a condições de estresse, as plantas desencadeiam uma série de reações que as permitem tolerá-lo, manifestando mudanças morfológicas e fisiológicas, as quais apresentam bases moleculares e genéticas (CASAGRANDE et al., 2001). Toda expressão fenotípica tem como base alterações no genótipo e interações deste com o meio ambiente. A cascata de eventos que resulta dessa interação pode ser investigada pela identificação dos genes responsáveis por tais características bem como pela expressão dos mesmos. Tal entendimento é de grande importância para o desenvolvimento de genótipos de feijão tolerantes à baixas temperaturas.

O advento das técnicas de biologia molecular, como seleção assistida por marcadores, transgenia, genômica, entre outras, incorporadas aos programas de melhoramento clássico, vem otimizando a obtenção de genótipos superiores e tolerantes, bem como, possibilitando o estudo e a descoberta de genes responsáveis pela tolerância a diferentes estresses abióticos. Existe uma série de metodologias moleculares, disponíveis para identificação destes genes, entre elas, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), *Differential Display - DD*, microarranjos de DNA (*MicroArrays*), entre outras, as quais diferem entre si, principalmente, no volume de informações obtidas e no custo de sua execução (FREEMAN et al., 2000).

A técnica da hibridização subtrativa supressiva (SSH) desenvolvida por Diatchenko et al. (1996), é hoje, uma das formas mais eficientes e indicadas para identificação de genes expressos em resposta aos estresses bióticos e abióticos (GUZZO, 2004), pois possibilita distinguir seqüências de cDNA diferencialmente expressas num indivíduo com e sem a presença de estresse (CASAGRANDE et al., 2001), por se basear na hibridização entre amostras de cDNA derivadas de tecidos

expostos a diferentes tratamentos. Genes expressos nos dois tratamentos, produzirão similar quantidade de mRNA, e consequentemente de cDNA, os quais em condições apropriadas e complementares hibridizarão e serão eliminados da amostra, enquanto que os cDNAs expressos apenas na condição de estresse são mantidos e amplificados exponencialmente.

Os transcritos enriquecidos oriundos da SSH, são utilizados para a criação de bibliotecas de cDNA, que consiste na inserção do fragmento de cDNA, em vetores de clonagem, seguido de sua multiplicação em células bacterianas competentes. Tais bibliotecas podem ser seqüenciadas, a fim de, se obter a seqüência nucleotídica que compõem os transcritos diferencialmente expressos, na condição de estresse por baixas temperaturas em feijão. Além disso, a partir do conhecimento da seqüência de DNA dos genes de interesse, é possível desenhar sondas específicas baseadas em PCR. Estes iniciadores poderão ser úteis na seleção assistida por marcadores moleculares nos estágios iniciais de desenvolvimento, a fim de verificar a presença ou não do gene que confere tolerância ao estresse. Tal tecnologia permite identificar indivíduos superiores com relativa facilidade (ZHANG e STOMMEL, 2001), bem como, há possibilidade da transformação genética via transferência de genes de interesse (BEEVER, 2000).

Em plantas, a técnica de hibridização subtrativa supressiva seguida da construção e seqüenciamento da biblioteca de cDNA foi realizada em culturas como, *Solanum tuberosum* com plantas infectadas com vírus-Y (NOVAK et al., 2006), em sementes de *Haloxylon ammodendron* submetidas o estresse osmótico (JIANG et. al., 2004), em cafeiro com tecidos de diferentes regiões da planta submetidos aos estresses bióticos e abióticos (VIEIRA et al., 2006), em genótipos de *Glycine Max* submetidos ao estresse hídrico (CASAGRANDE et al., 2001). Tais estudos permitiram à identificação de novos genes diferencialmente expressos em resposta as condições submetidas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar fragmentos de genes diferencialmente expressos em genótipos de feijão induzidos com o estresse a baixa temperatura no período da germinação.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Extração do RNA total

As extrações de RNA total foram realizadas no laboratório de Análises Genéticas do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (IMEGEM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Os genótipos utilizados para este estudo foram IAPAR 81, genótipo tolerante a baixa temperatura e Pérola genótipo sensível, caracterizados no Capítulo 1. A extração do RNA total foi realizada utilizando as folhas de tais genótipos, nas duas condições de germinação (10 e 25 °C) que estavam armazenadas a -80 °C. As quatro extrações foram realizadas utilizando o reagente comercial TRIzol (Invitrogen, USA): 1^a e 2^a: genótipo tolerante na condição de estresse (*Tester* tolerante) e na condição testemunha (*Driver* tolerante); 3^a e 4^a: genótipo sensível na condição de estresse (*Tester* sensível) e na testemunha (*Driver* sensível).

Os instrumentos utilizados na extração foram tratados com NAOH 0,5 N por um período de 18 horas para inativação de RNAses e esterilizados por 20 minutos a 120 °C. A microcentrifuga utilizada no experimento (Eppendorff 5403 C) foi mantida durante todo o processo a 4 °C.

O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de 1,5 ml (livre de RNAses), adicionado 1,0 mL de TRIzol e agitado. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio, procedeu-se a homogeneização e centrifugação a 14.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram acrescentados 500 µL de Isopropanol 100% e mantido em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 2X com etanol 75 % e centrifugado a 5.000 g por 5 minutos.

Após o descarte do etanol, o pellet de RNA foi seco e dissolvido em 20 µl de água estéril livre de RNAses. A qualidade do material extraído foi analisada em gel de agarose 1,5 % e a análise quantitativa em espectrofotômetro (Biophotometer Eppendorf) e em seguida armazenado a -80 °C.

3.4.2 Hibridação Subrativa Supressiva seguida por PCR

A identificação dos genes induzidos pelo estresse térmico (10 °C) nos genótipos IAPAR 81 e Pérola após a indução do estresse na germinação, foi realizada com a técnica da Hibridização Subrativa Supressiva (DIATCHENKO et al., 1996; GURSKAYA et al., 1996). Esta técnica permite a obtenção de bibliotecas subtraídas de cDNA, as quais devem conter os genes diferencialmente induzidos pelo frio. Para tanto, foi utilizado o Kit *PCR Select™cDNA Subtraction Kit* (Cat. No. 637401, Clontech) conforme instruções do fabricante.

Foram construídas duas bibliotecas de cDNA, onde uma delas referia-se aos transcritos diferencialmente expressos no genótipo IAPAR 81 após o estresse, e a outra aos transcritos do genótipo Pérola. Para a realização das hibridizações em ambos os genótipos considerou-se as plantas submetidas ao estresse de 10 °C como *Tester* e as plantas do tratamento controle (25 °C) como *Driver*.

3.4.2.1 Síntese dos cDNAs *Tester* e *Driver*

A síntese da primeira fita de cDNA é feita pela enzima de origem viral *Transcriptase reversa* (AMV), uma polimerase que utiliza a fita de RNA como molde para síntese de DNA. Desta forma, as moléculas de RNAm portadoras da cauda poli-A, estabelecem pontes de H com segmentos iniciadores contendo sítios de reconhecimento (cauda poli-dT 5' -TTTTGTACAAGCTT(30)-3').

A síntese da 1^a fita de cDNA foi realizada adicionado em um microtubo 4,0 µL de RNA total e 1,0 µL do iniciador cDNA Synthesis Primer (10 mM). A reação foi encubada a 70°C por 2 min e em seguida resfriada em gelo por 2 min. Neste mesmo microtubo foram adicionados 2,0 µL do tampão da 1^a fita (5X), 1,0 µL de dNTP (10 mM cada), 1,0 µL de água estéril e 1,0 µL da enzima *AMV transcriptase reversa* (20 U mL-1). A reação foi incubada por 90 min a 42 °C. Transcorrido este período os microtubos foram colocados em gelo para finalizar da síntese da 1^a fita.

Para a síntese da 2^a fita de cDNA foram adicionados nos mesmos microtubos contendo a reação da 1^a fita de cDNA, 48,4 µL de água estéril, 16,0 µL de tampão da 2^a fita de cDNA, 1,6 µL do mix dNTP (10 mM) e 4,0 µL de 20X Second-Strand Enzyme Cocktail. Homogeneizou-se gentilmente e incubou-se por 2 h a 16 °C. Ao final deste período 6 U da enzima *T4 DNA Polimerase* foram adicionados aos microtubos, e novamente encubados por 30 minutos a 16 °C.

Transcorrido o período 30 minutos a purificação e recuperação dos cDNAs sintetizados foi realizada conforme recomendado no manual do Kit *PCR Select™cDNA Subtraction*. Aos cDNAs sintetizados foram adicionados 100 µL de Fenol: Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 16.000 g à temperatura ambiente. A camada aquosa superior foi removida e transferida para outro microtubo e a interfase e a fase inferior descartadas. Ao transferido foram adicionados 100 µL de Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugando por 10 minutos a 16.000 g. A camada foi novamente coletada e transferida para um novo microtubo. Foram adicionados 40 µL de acetato de

amônio (4M) e 300 μ L de Etanol Gelado (95%). A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 20 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi removido e o cDNA precipitado com 500 μ L de Etanol Gelado (80%) e centrifugado por 10 minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi removido e o precipitado seco em temperatura ambiente e em seguida ressuspenso em 50 μ L.

Para avaliação do rendimento e tamanho dos cDNAs sintetizados 6 μ L do material ressuspenso foi aplicado em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio e visualizado com auxílio de luz ultravioleta.

3.4.2.2 Digestão dos cDNAs obtidos com a enzima *Rsa* I

Esta etapa é necessária para possibilitar a ligação dos adaptadores nas moléculas de cDNA na próxima etapa, os quais facilitam as amplificações via PCR dos fragmentos diferencialmente expressos. A enzima *Rsa* I age no reconhecimento de quatro nucleotídeos 5' GT|AC 3'.

Em microtubos estéreis foram adicionados 43,5 μ L do cDNA fita dupla anteriormente produzidos, 5 μ L do tampão de *Rsa* I (10x) e 1,5 μ L da enzima *Rsa* I (10 U μ L⁻¹). A mistura foi incubada por 2 h a 37 °C em banho-maria. Transcorrido este período foram adicionados 2,5 μ L EDTA/glicogênio para finalizar a digestão.

Em seguida foi realizada a purificação dos cDNAs digeridos dos demais componentes da reação conforme recomendado no manual do *Kit PCR Select™cDNA Subtraction* como descrito anteriormente. Ao final da recuperação, obteve-se um precipitado de cDNA o qual foi seco em temperatura ambiente e em seguida ressuspenso em 5,5 μ L de água estéril. A avaliação da eficiência da digestão com *Rsa* I foi realizada pela comparação entre as amostras dos cDNAs antes e após a digestão, revelados em gel de agarose (1,5%) e corado com brometo de etídio.

Comprovada a eficiência da digestão enzimática, as amostras *Tester* foram ligadas aos adaptadores, enquanto que a população de moléculas *Drivers* foram armazenadas a - 20 °C não sendo ligadas aos adaptadores.

3.4.2.3 Ligação dos adaptadores ao cDNA *Tester* digerido com *Rsa* I

Para a ligação dos adaptadores foi diluído 1 μ L de cada cDNA *tester* digerido em 5 μ L de água estéril. As populações *Testers* diluídas dos genótipos IAPAR 81 e Pérola foram subdivididas, cada um deles, em duas alíquotas (1 e 2) em microtubos estéreis. Uma das alíquotas recebeu o adaptador 1 e a outra o adaptador 2R, resultando

em duas populações de *Tester* (1) e (2) de cada genótipo. A reação de ligação dos adaptadores consistiu na combinação dos itens listados na Tabela 4.

Tabela 4: Componentes utilizados na ligação dos adaptadores nas populações *Testers* de cDNA.

Componentes	Quantidades	
	Tubo 1: cDNA <i>Tester</i> 1-1	Tubo 1: cDNA <i>Tester</i> 1-2
cDNA tester diluído	2 µL	2 µL
Adaptador 1*	2 µL	-----
Adaptador 2R**	-----	2 µL
<i>T4 DNA ligase</i> (400 U µL-1)	1 µL	1 µL
Tampão de ligação (5X)	2 µL	2 µL
Água estéril)	3 µL	3 µL
Volume final	10 µL	10 µL

* Adaptador 1: 5'- CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGCAGGT-3'

** Adaptador 2R: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCCGGCCGAGGT-3'

A mistura foi incubada por 12 h a 16 °C. Transcorrido este período a reação de ligação foi interrompida adicionando-se 1 µL de EDTA/Glicogênio aos microtubos e o aquecimento por 5 minutos a 72°C inativou a *T4 DNA ligase*.

3.4.2.2 Reações de Hibridizações

As etapas de hibridização visam a seleção de moléculas de cDNA expressas diferencialmente nos genótipos estudados na condição de estresse ou *Tester*. Assim, foram realizadas duas etapas de hibridizações, a primeira objetivando equalizar as seqüências diferencialmente expressas e a segunda hibridização com o propósito de gerar moldes para amplificação via PCR das seqüências de interesse.

Os constituintes da primeira reação de hibridização estão listados na Tabela 5. Após a mistura dos componentes, as reações foram submetidas a desnaturação a temperatura de 98 °C por 90 segundos e posteriormente encubadas por 8 h a 68 °C.

Ao término da primeira hibridização foi iniciada a segunda. Primeiramente foi preparado o Mix desnaturado (90 segundos a 98°C) de cDNA *Driver* digerido com *Rsa* I, com os componentes descritos na Tabela 5. Na seqüência, o conteúdo proveniente da primeira hibridização (*Tester* com adaptador 1 e *Tester* com adaptador 2R) foram misturados em um único recipiente e a eles adicionado o Mix desnaturado.

A reação foi incubada por 12 h a 68°C para interação entre as moléculas de cDNA. Ao término das 12 h a adição de 200 µL do tampão de diluição e o aquecimento das amostras por 7 minutos a 68°C finalizou a segunda hibridização.

Tabela 5: Montagem da primeira e segunda hibridização de cDNA *Tester* e *Driver*. Descrição dos componentes e quantidade (μL) utilizadas em cada reação.

Componentes	Quantidades	
	Hibridização da amostra 1	Hibridização da amostra 2
Primeira Hibridização		
cDNA <i>Driver</i> digerido com <i>Rsa</i> I	1,5 μL	1,5 μL
cDNA <i>Tester</i> 1-1 ligado ao adaptador 1	1,5 μL	-----
cDNA <i>Tester</i> 1-2 ligado ao adaptador 2R	-----	1,5 μL
Tampão de hibridização 4X	1,0 μL	1,0 μL
Volume final da 1 ^a Hibridização	4,0 μL	4,0 μL
Segunda Hibridização		
Mix desnaturado de cDNA <i>Driver</i> (1,0 μL cDNA “ <i>Driver</i> ” digerido com <i>Rsa</i> I, 1,0 μL do Tampão de hibridização 4X e 1,0 μL de água estéril)		1,0 μL
Amostra 1 após a 1 ^a hibridização		4,0 μL
Amostra 2 após a 1 ^a hibridização		4,0 μL
Volume final da 1 ^a Hibridização		10,0 μL

Ao final dos processos de hibridização cinco diferentes tipos de moléculas são formadas: moléculas do tipo 1 que correspondem a mensagens muito ou pouco abundantes na amostra *Tester* por isso ficarão equalizadas; moléculas do tipo 2 que por serem muito abundantes formam facilmente o re-pareamento das fitas originais; moléculas do tipo 3 que são hibridas e correspondem a genes expressos nas amostras *Tester* e *Driver* e moléculas do tipo 4 e 5 que são sobras de moléculas *Driver* adicionadas em excesso. Ao final da segunda hibridização estas cinco moléculas estarão presentes, mais a molécula de tipo 6 que representa mensagens diferencialmente expressas na condição de estresse e que serão amplificadas exponencialmente na PCR pois possuem diferentes adaptadores (Figura 1).

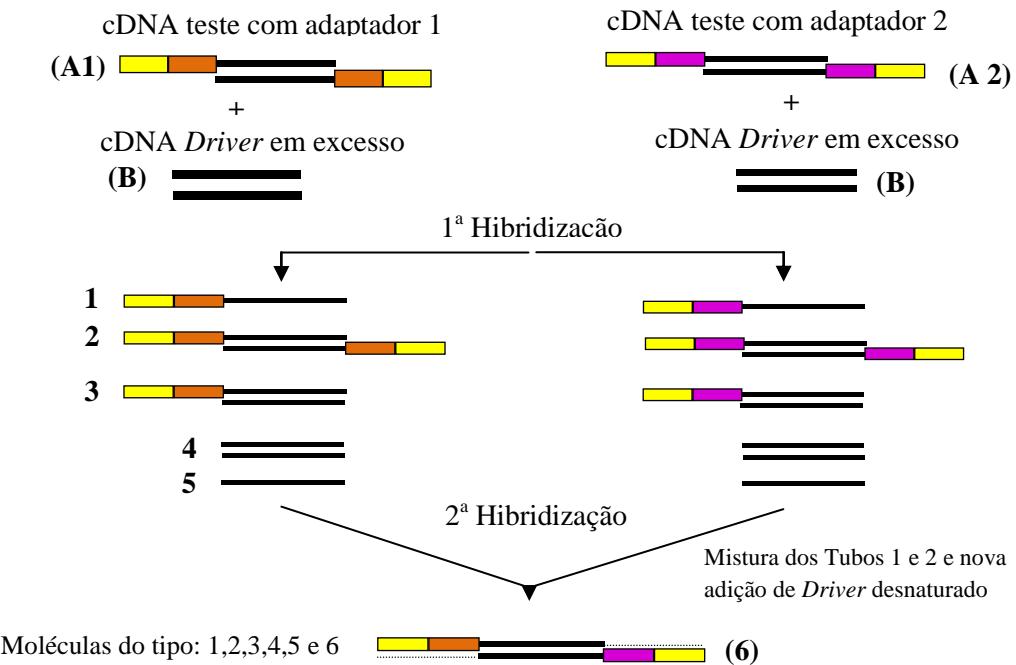


Figura 1: Esquema da hibridação aleatória das moléculas de cDNA após a primeira (*Tester + Driver*) e segunda (população 1 e 2 de *Tester + Driver*) hibridação subtrativa, com a formação de cinco diferentes tipos de moléculas de cDNA.

3.4.2.3 Reações de amplificação por PCR

As reações de amplificação são denominadas supressivas visto que, fragmentos de cDNA portadores do mesmo tipo de adaptador nas extremidades são eliminadas do processo devido a formação de uma estrutura em alça. Já, moléculas portadoras de ambos os adaptadores são amplificadas exponencialmente na PCR (Figura 2).

Para tanto, foram realizadas duas amplificações. A primeira com o objetivo de amplificar exponencialmente moléculas do tipo 6 (Figura 1), e a segunda a fim de eliminar restos de adaptadores e enriquecer ainda mais as seqüências de interesse. Nas reações da PCR demonstradas na Figura 2, moléculas do tipo 1 e 4 não serão amplificadas pois não possuem sítio de pareamento com o *primer* na extremidade 3'. Moléculas do tipo 2 também não serão amplificadas pois há uma grande chance de pareamento estável entre as extremidades 5' e 3' da mesma molécula, que são complementares numa extensão de 44 nucleotídeos, levando à formação de estrutura em alça não possibilitando o pareamento do *primer*; Moléculas do tipo 3 serão amplificadas linearmente, pois apenas uma das fitas apresentam pareamento com o *primer* na extremidade 3'. E moléculas do tipo 6, as quais serão amplificadas exponencialmente devido terem diferentes adaptadores nas extremidades 3' e 5', não

sofrendo o efeito supressivo e possibilitando assim o pareamento do *primer* nas extremidades 3' de ambas as fitas.

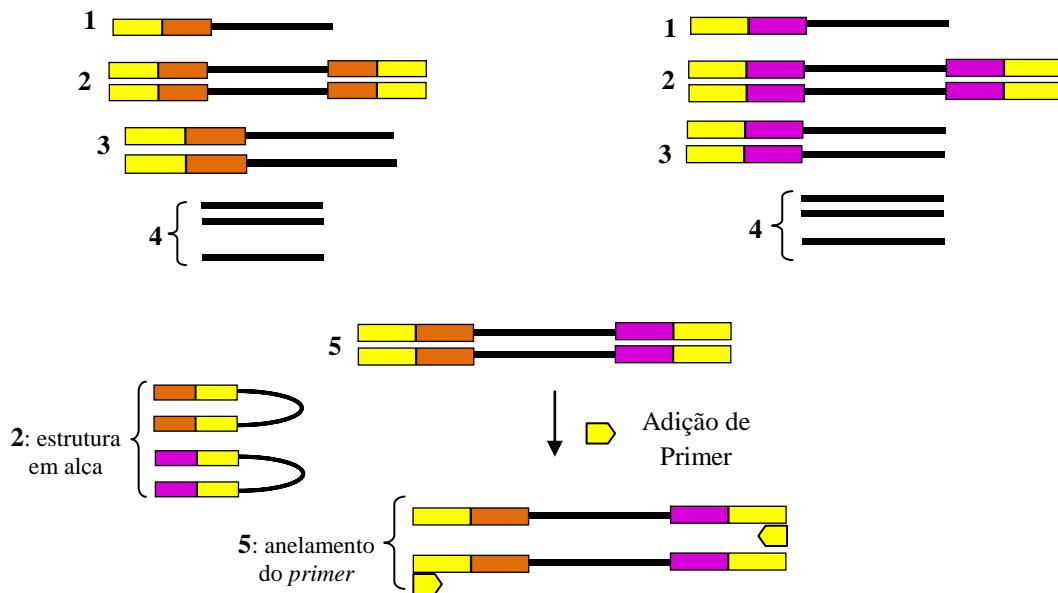


Figura 2: Esquema representativo ilustrando a reação supressiva da PCR, na qual as diferentes moléculas formadas após a segunda hibridização apresentam diferentes caminhos.

Os componentes utilizados para preparar as reações de amplificação estão listados na Tabela 6. Para a primeira reação de amplificação, inicialmente foi preparado o mix contendo água estéril, tampão de reação de PCR, dNTP, iniciador 1 e *Platinum Taq High Fidelity*. Em seguida 24,0 μ L do mix foi transferido para um novo microtubo e adicionado o cDNA proveniente da segunda hibridização. A reação foi então submetida a termociclagem (VeritiTM 96 well Thermal Cycler) (Tabela 6).

O primeiro ciclo da PCR é realizado para que a *DNA Polimerase* estenda as seqüências dos adaptadores e assim possibilite o anelamento do iniciador 1. Os demais ciclos são para amplificar exponencialmente as seqüências de interesse.

Após o término da primeira reação de PCR sua eficiência foi avaliada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e sua imagem foi fotoregistrada. Comprovada a eficiência procedeu-se para a segunda PCR.

Tabela 6: Componentes, quantidades (μ L) e programa de ciclagem utilizados na primeira e segunda reação de amplificação.

Primeira amplificação de PCR		
Componentes da reação	Quantidades	Programa de Ciclagem
cDNA após a 2 ^a hibridização	1,0 μ L	1 Ciclo
H ₂ O estéril	19,5 μ L	5 minutos a 75°C
10X PCR reaction buffer ¹	2,5 μ L	25 segundos a 94 °C
dNTP mix (10 mM)	0,5 μ L	27 ciclos
PCR primer 1 (10 μ M)	1,0 μ L	94°C por 10 segundos
Platinum Taq High Fidelity (5U/ μ L)	0,5 μ L	66°C por 30 segundos
Volume final	25,0 μ L	72°C por 90 segundos.
Segunda amplificação de PCR		
Produto de cDNA após 1 ^a PCR	1,0 μ L	
H ₂ O estéril	18,5 μ L	
10X PCR reaction buffer	2,5 μ L	12 ciclos
<i>Nested</i> PCR primer 1 (10 μ M)	1,0 μ L	94°C 10 segundos
<i>Nested</i> PCR primer 2R (10 μ M)	1,0 μ L	68°C 30 segundos
dNTP mix (10 mM)	0,5 μ L	72°C 1,5 minutos
Platinum Taq High Fidelity (5U/ μ L)	0,5 μ L	
Volume final	25,0 μ L	

*Iniciador 1: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

**Nested PCR primer 1: 5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGCAGGT-3' e

***Nested PCR primer 2R: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

Inicialmente o produto resultante da primeira amplificação foi diluído em água estéril (3:27). Em seguida, um alíquota desta diluição foi adicionada ao mix contendo água estéril, tampão de reação de PCR (10X), oligonucleotídeos *Nested* PCR primer 1 e *Nested* PCR primer 2R, dNTP e a enzima *Platinum Taq High Fidelity*. Após homogeneizado os reagentes as reações foram submetidas a termociclagem (Tabela 6).

O produto resultante da segunda amplificação foi aplicado em gel de agarose 2%, corando com brometo de etídio, visualizando sob luz ultravioleta e fotoregistrado para avaliação dos fragmentos existentes.

3.4.2.4 Clonagem dos fragmentos diferencialmente expressos e transformação bacteriana

Comprovada a presença de fragmentos diferencialmente expressos nos genótipos, tolerante e sensível, nas condições de estresse, obtidos após técnicas de análise da expressão diferencial (SSH), estes foram ligados em vetor pGEM-T Easy vector (Cat. No. A3600, Promega) que possui como marcas de seleção resistência ao antibiótico ampicilina e marcador β -galactosidase, numa reação contendo *T4* DNA

ligase e tampão da enzima, a qual foi incubada por 18 horas a 16 °C para a ligação vetor + inserto.

Em seguida a ligação, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *Escherichia coli*, linhagem pMOS Blue, por meio do choque térmico, onde em uma alíquota de 200 µL de células competentes foram adicionados 100 ng de DNA transformante, e a mistura incubada em gelo por 30 minutos, seguida do aquecimento a 42 °C por 40 segundos e novamente incubadas em gelo por 2 minutos. Em seguida, 1,0 mL do meio LB foi adicionado a mistura e esta incubada por 1 hora a 37 °C sobre agitação de 460 g (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). O choque térmico desestabiliza momentaneamente a membrana da bactéria e permite a entrada dos plasmídeos recombinantes.

Em seguida, a solução foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura LB agar acrescido de 50 mg mL⁻¹ de ampicilina, 15 µg mL⁻¹ de tetraciclina, IPTG e X-gal (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). As placas inoculadas foram incubadas por 18 horas a 37 °C, para posterior repicagem das colônias brancas, as quais correspondem a colônias de bactérias que receberam os plasmídeos contendo insertos de cDNAs, culminando na ativação do sistema de seleção IPTG/X-gal. As colônias brancas, foram transferidas uma a uma, para tubos contendo 5,0 mL de meio de cultura LB líquido com 50 mg mL⁻¹ de ampicilina e mantidas a 37 °C por 24 horas, sob agitação de 460 g para sua multiplicação individual. Em seguida, as células bacterianas foram precipitadas pela centrifugação a 23.000 g por 5 minutos, seguida do descarte do sobrenadante.

3.4.2.5 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído das células de *E. coli* por meio da lise alcalina (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), o qual visa extrair o DNA recombinante íntegro e eliminar os demais componentes celulares, inclusive o DNA genômico.

Assim, ao precipitado de células bacterianas foram adicionados 200 µl da solução I (Tris, EDTA e glicose) previamente resfriada, homogeneizada e mantida a 20 °C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µl da solução II (SDS e NaOH), misturado por inversão e mantidas no gelo por 5 minutos. Decorrido este período, 150 µl da solução III (Acetato de Potássio 3M) foram acrescentados à solução, homogeneizado, encubado no gelo por 5 minutos e então centrifugado por 5 minutos a 23.000 g. Foram transferidos 500 µl do sobrenadante e neles adicionados 500 µl de

fenol/clorofórmio 1:1, homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 23.000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nela adicionado 1,0 ml de clorofórmio, misturado e centrifugado por 5 minutos a 16.000 g. Novamente a fase aquosa foi transferida e o DNA precipitado com 700 μ l de etanol absoluto.

Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado 2X com etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 23.000 g. O pellet foi seco e ressuspensos em 30 μ l de TE pH 8,0 contendo RNase (1mg mL⁻¹). As amostras permaneceram por 1 hora a 37 °C. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 0,8%, e a concentração estimada pela comparação com amostras conhecidas de DNA.

3.4.2.6 Reação de Seqüenciamento e purificação das amostras

Para a reação de seqüenciamento foram utilizando o oligonucleotídeo universal M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), que anela ao vetor pGEM próximo ao sítio de inserção do fragmentos de interesse. As amostras foram marcadas com o kit Big Dye Terminator® v.3.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems), que contém dinucleotídeos e dideoxinucleotídeos marcados com corantes fluorescentes (fluoraceína e rodamina). Uma reação contendo DNA recombinante, oligonucleotídeo M13R e fluorescente Big Dye, foi submetida a termociclagem de: 96 °C (2'); 96 °C (30'); 52 °C (30'') e 60 °C (4') por 30 ciclos. Finalizada a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol 65 % (v/v) e purificadas com etanol 70 % (v/v). Após secas as amostras foram ressuspensas em formamida, desnaturadas por 5 minutos a 95 °C seguidas de 3 minutos no gelo, e submetidas ao seqüenciamento em seqüenciador automático ABI prism 3130 Genetic Analyze (Applied Biosystems).

No seqüenciamento, enquanto os fragmentos de DNA migram no gel para a separação eletroforética, um laser excita a fluoraceína que excita a rodamina, então cromóforos emitem sinais em forma de cromatograma, que produzem picos representando as bases nitrogenadas identificadas através das diferentes cores.

As seqüências obtidas foram revisadas manualmente utilizando os softwares de acesso livre BioEdit Sequence Alignment editor 7.0 e Chromas 2.33, a região seqüenciada do vetor removida, e o alinhamento das seqüências foi realizado com o ClustalW e então comparadas no Genebank com o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Extração do RNA total

Em estudos de expressão gênica, o material genético que origina a investigação é o ácido ribonucléico (RNA), pois a expressão gênica é o primeiro estágio de um processo que decodifica a informação contida no DNA de uma célula, onde a informação contida no gene dá origem a uma proteína, com o intermediário do RNA, por meio da transcrição da informação contida no DNA, para o RNA. Desta forma, o organismo expressa determinados genes, para produção de certas proteínas, apenas nos momentos de sua vida que ele as necessita, como exemplo, em condições de estresse por baixas temperaturas. Por este motivo, os estudos de expressão genética partem do codificador destas proteínas, ou seja, o RNA. Tal motivo justifica a extração deste material genético dos genótipos supracitados.

As extrações de RNA total apresentaram bons resultados na avaliação quantitativa das leituras espectrofotométricas. Verifica-se que houve diferença na quantidade de RNA entre as amostras extraídas (3.237,4 a 10.610,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo o rendimento obtido suficiente para a realização da SSH. Os valores obtidos da relação A260/A280 (de 1,64 a 1,98) (Tabela 4) indicam baixo nível de contaminação com proteínas, pois os ácidos nucléicos apresentam ótima absorbância em 260 nm e proteínas em 280 nm (WINFREY et al., 1997).

Tabela 7. Relações espectrofotométricas (A260/A230 e A260/A280) das amostras de RNA total dos genótipo IAPAR 81 e Perola nas condições *Tester* e *Driver*, extraído de folhas de feijão com o reagente TRIzol submetidas a diferentes temperaturas (Temp.).

Cultivar	Classificação	Temp.	A260/A230	A260/A280	Quantidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
IAPAR 81	<i>Tester</i> tolerante	10 $^{\circ}\text{C}$	2,21	1,98	3.237,4
	<i>Driver</i> tolerante	25 $^{\circ}\text{C}$	1,92	1,64	6.928,9
Pérola	<i>Tester</i> sensível	10 $^{\circ}\text{C}$	1,57	1,78	7.621,7
	<i>Driver</i> sensível	25 $^{\circ}\text{C}$	1,85	1,89	10.610,3

A relação A260/A280 reflete a pureza do RNA total, onde, amostras com RNAs puros apresentam valores entre 1,8 a 2,1 (LONGEMAN et al., 1987). A relação indica que o RNA total extraído é de boa qualidade e está próximo aos níveis requeridos de

pureza. Extrações de RNA total utilizando o reagente TRIzol apresentaram valores de $0,57 \pm 0,23$ para relação 260/230 e $1,57 \pm 0,13$ 260/280 e rendimento de $31,66 \pm 15,45$ ($\mu\text{g}/100 \text{ mg}$) (MA e YANG, 2005). No entanto, tais amostras não apresentaram problemas nas reações subseqüentes, bem como neste experimento.

A integridade do RNA total pode ser verificada na Figura 3, onde, se observa a presença de duas bandas distintas, as quais, representam as porções ribossomais (28S e 18S), sem muito arraste, o que sugere o sucesso da extração realizada, bem como ausência da degradação do RNA, indicando ausência de RNases.

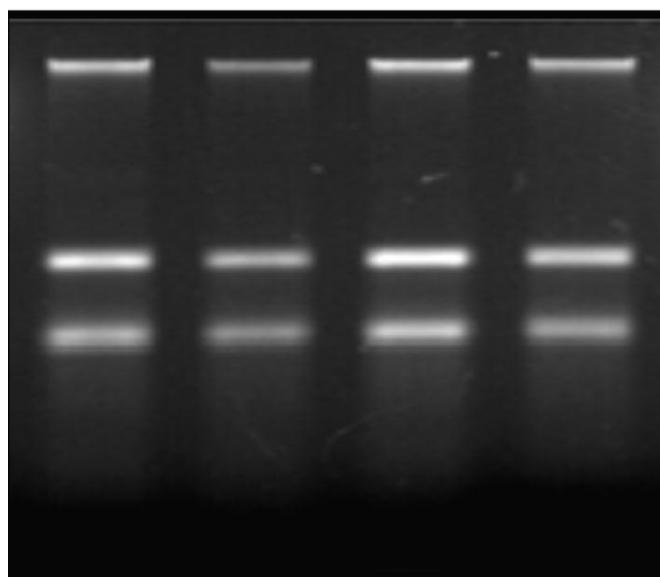


Figura 3. Qualidade do RNAtotal extraído com TRizol, revelado em gel de agarose 1%. Da esquerda para a direita tem-se o genótipo IAPAR 81 na condição *Tester* e *Driver*, seguida do genótipo Perola *Tester* e *Driver*.

3.5.2 Hibridização subtrativa supressiva seguida por PCR

O genoma completo de plantas superiores é composto por milhares de genes que controlam seu crescimento e desenvolvimento, sendo seu seqüenciamento por completo, um processo demorado e oneroso, apesar das modernas técnicas de biologia molecular. Neste contexto, a construção de bibliotecas de cDNA e seu seqüenciamento, são úteis para análises de expressão gênica diferencial, na busca de genes envolvidos, diretamente com os mecanismos de tolerância a estresse abiótico, como baixas temperaturas. Técnicas como a hibridação subtrativa supressiva são satisfatórias para o isolamento de genes diferencialmente expressos em condições de estresse, e necessárias para entender com maior profundidade os mecanismos que regulam estes processos (GURSKAYA et al., 1996).

De posse de RNA de boa qualidade, a hibridização subtrativa supressiva foi realizada com sucesso, sendo avaliada a eficiência em cada uma das etapas transcorridas, antes de prosseguir adiante, obtendo-se com êxito seqüências diferencialmente expressas na condição de estresse por baixa temperatura, nos genótipos IAPAR 81 (tolerante) e Pérola (sensível) após as hibridizações, subtrativa e supressiva (SSH). Os produtos obtidos após a SSH, e amplificações via PCR, podem ser verificados no gel de agarose (Figura 4). Da esquerda para direita, na primeira canaleta estão o padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb), e os produtos do primeiro e segundo PCR dos genótipos Pérola e IAPAR 81 (Figura 4).

A presença das bandas no gel de agarose representa o sucesso do procedimento, visto que, as hibridizações funcionam como um sistema de “peneiras”, onde, nas reações, as fitas de cDNA após desnaturadas, independente se foram provenientes da amostra *Tester* ou *Driver*, se unem formando a dupla-hélice. Amostras hibridas que possuem em suas extremidades os dois tipos de adaptadores são amplificadas exponencialmente nos ciclos do PCR, enquanto as demais moléculas de cDNA, hibridas ou não, mas que, não possuem os dois tipos de adaptadores, são eliminadas da reação, pois não possuem sítios de ligação dos primers 1 e 2R. Desta forma, se não houvessem fragmentos de genes diferencialmente expressos na condição de estresse, não haveriam moléculas contendo os dois adaptadores, e consequentemente, não haveria amplificação exponencial, e nada seria revelado no gel da Figura 4.

Verifica-se que para o genótipo tolerante IAPAR 81 (4^a e 5^a canaleta), há diversas bandas, estas de tamanho desde 200 até 1100 pb, indicando a presença de fragmentos diferencialmente expressos na condição de estresse de diversos tamanhos, neste genótipo. Por outro lado, o genótipo sensível Pérola (2^a e 3^a canaleta), apresentou um pequeno número de bandas, nas quais os fragmentos possuem tamanho de 300 a 800 pb. Este resultado indica que o genótipo sensível em condições de estresse também expressa genes diferencialmente da condição ideal de germinação, no entanto, em magnitude muito inferior ao genótipo tolerante. Tal fato evidencia que o genótipo sensível também apresenta expressão diferencial em condições de estresse, no entanto, tais genes não são suficientes para lhe conferir a tolerância como no IAPAR 81.

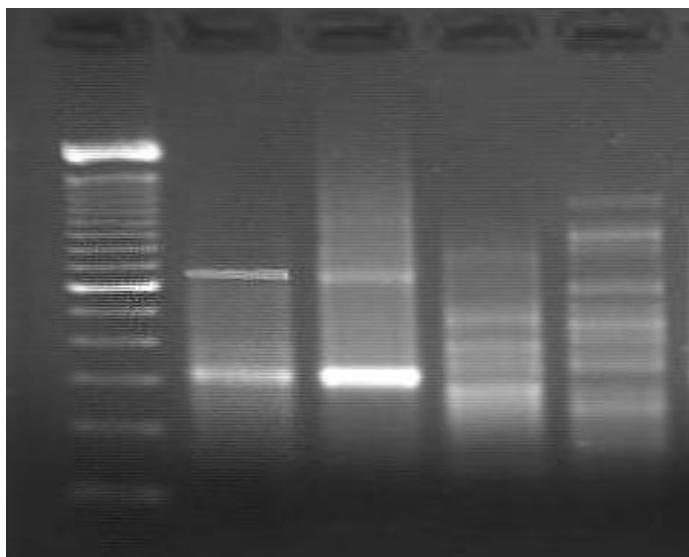


Figura 4. Gel de agarose dos produtos do 1^a e 2^a PCR, das populações de cDNA obtidas após a SSH. Na ordem da esquerda para direita, tem-se o padrão de peso molecular de 100 pb, 1^o e 2^o PCR do genótipo Pérola, seguida do 1^o e 2^o do genótipo IAPAR 81.

Uma biblioteca de genes diferencialmente expressos construída utilizando a técnica SSH, pode produzir um variedade de fragmentos de diferentes tamanhos. Um banco de cDNA construído da interação de *T. harzianum* crescido em parede celular de *F. solani*, apresentou insertos de tamanho que variaram de 250 a 4000 pb, mostrando uma grande variedade de fragmentos (STEINDORFF, 2009). Em estudos com expressão diferencial em resposta ao estresse hídrico em cana de açúcar, Rodrigues, (2008) encontrou genes sendo expressos, tanto no genótipo tolerante, quanto no sensível, porém o genótipo tolerante apresentou maior diversidade de fragmentos, os quais possivelmente representam os genes responsáveis pela tolerância ao estresse.

3.5.3 Clonagem dos insertos, transformação bacteriana e extração plasmidal

Uma biblioteca de genes é uma coleção de fragmentos de DNA de uma determinada espécie, e geralmente são representativas de todo genoma do organismo. Por outro lado, as bibliotecas de cDNA (DNA complementar), possuem apenas genes relacionados a uma determinada condição, por exemplo, os genes que se expressaram nos genótipos de feijão IAPAR 81 ou Pérola, quando submetidos ao estresse por baixas temperaturas.

De posse, da presença de fragmentos diferencialmente expressos, nos genótipos IAPAR 81 e Pérola, a biblioteca de cDNA foi construída com sucesso, sendo comprovada a eficiência ligação do vetor + inserto de cDNA e seu implante no interior

da célula bacteriana, pelo crescimento destas colônias de *E. coli* em meio contendo o antibiótico ampicilina, visto que, o plasmídeo circular confere a bactéria, resistência ao antibiótico, possibilitando assim sua sobrevivência neste meio. O plasmídeo linearizado, com pontas digeridas de final T, somente apresenta conformação circular, quando ligado ao inserto de extremidades A, e estando ele circular, penetra na bactéria e lhe confere a resistência, nos possibilitando aferir, o sucesso do procedimento. A engenharia genética permite a introdução de genes codificantes em células hospedeiras facilmente cultiváveis, após promotores reguláveis presentes em elementos genéticos independentes, principalmente, plasmídeos (YOKOHAMA, 2003).

Das colônias desenvolvidas, foram construídas duas bibliotecas de cDNA, com o isolamento de 297 clones do genótipo tolerantes IAPAR 81 e 232 clones do genótipo sensível Pérola. A construção de bibliotecas de cDNA é um passo fundamental para realização do seqüenciamento, onde é possível desvendar o conjunto de nucleotídeos dos fragmentos diferencialmente expressos, nos genótipos IAPAR 81 e Pérola.

Ao estudar genes envolvidos no reconhecimento e vias de sinalização de *C. chinense* infectados com PHYVV, foi construída uma biblioteca de genes com 99 clones obtidos após a SSH, com fragmentos contendo entre 250 e 750 pb, os quais foram suficientes para identificar proteínas associados diretamente com o controle da doença (GONZALES et. al. 2008). Em estudos com estresse osmótico em *Haloxylon ammodendron*, a biblioteca construída continha cerca de 400 recombinantes com genes diferencialmente expressos, de fragmentos de DNA de em média 500 pb (JIANG et al., 2004). Tais trabalhos demonstram, que o número de colônias aqui isoladas, são suficientes para realizar o seqüenciamento e desvendar genes relacionados a tolerância do feijão as baixas temperaturas na germinação.

Para a realização do seqüenciamento é necessário que os clones sejam purificados, e o DNA plasmídial isolado. A metodologia da lise alcalina (SAMBROK e RUSSEL, 2001) é um método eficaz no isolamento do DNA recombinante quando a utilização de kits comerciais torna-se um processo oneroso e muitas vezes inviável. Desta forma, é possível visualizar a eficiência da técnica da lise alcalina, em alguns clones isolados (Figura 5). Verifica-se no gel de agarose que o procedimento foi realizado com sucesso, sendo possível visualizar nitidamente duas bandas características de uma extração plasmidial, situadas acima de 2.500 pb, indicando ser o recombinante (vetor + inserto).

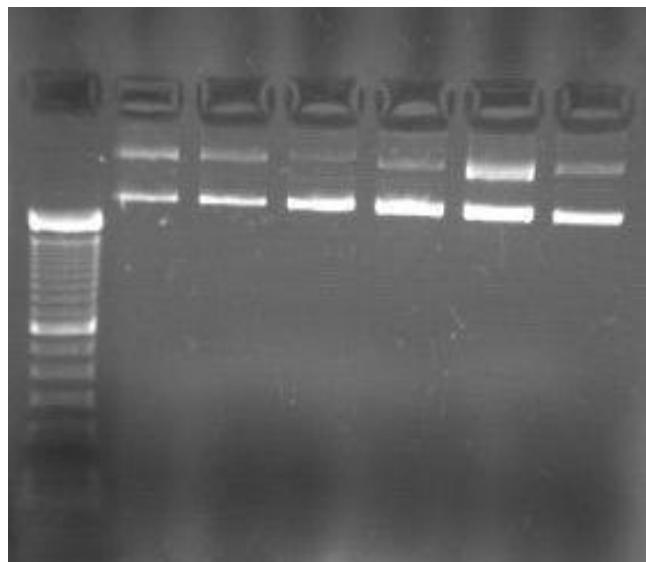


Figura 5. Perfil eletroforético de DNA plasmidial isolado de clones contendo cDNA. A primeira canaleta corresponde ao padrão de peso molecular de 100 pb e as demais canaletas a clones purificados.

O seqüenciamento foi realizado apenas na biblioteca de cDNA do genótipo IAPAR 81, a qual possui os genes de maior importância, ou seja, os responsáveis pela tolerância as baixas temperaturas. Das 297 colônias isoladas, apenas 105 clones foram purificados e seqüenciados, dos quais após a retirada dos fragmentos pertencentes ao vetor, que são juntamente seqüenciados, e do alinhamento pelo Clustalw, foram obtidas 20 grupos os quais contêm seqüências idênticas, como por exemplo, o grupo 1, que possui 11 seqüências redundantes, representando a superexpressão desta seqüência no genótipo IAPAR 81 em condições de estresse. Em contrapartida, 18 clones apresentaram seqüências únicas, ou seja, em nenhum dos demais clones seqüenciados, tais seqüências foram observadas, indicando serem estas, possivelmente seqüências, que representam genes que são diferencialmente expressos em pequenas proporções na condição de baixas temperaturas em feijão (Apêndice 2).

As seqüências diferencialmente expressas são validadas com a realização do BLAST, onde são procuradas nos banco de dados, seqüências similares com as obtidas. A similaridade entre as seqüências obtidas e as depositadas no banco de dado foi considerada significativa somente quando o valor de E-value foi menor que 10^{-5} e estas apresentavam identidade maior que 97%. Verifica-se que três classes de seqüências não tiveram homologia com nenhuma seqüência depositada no GenBank, totalizando 7,6% do total de seqüências obtidas. Em contrapartida 92,4% encontraram homologias com

seqüências depositadas as quais correspondem a diferentes espécies entre elas *Phaseolus vulgaris* e *Glycine Max* (Apendice 2).

Apesar da pequena porcentagem de seqüências encontradas sem homologia, sua descoberta é de grande importância, pois estas podem estar relacionadas a genes específicos expressos no genótipo IAPAR 81 na condição de estresse por baixas temperaturas, que o conferem a tolerância. A possibilidade da ocorrência de seqüências desconhecidas corresponderem a transcritos de genes ainda não identificados é grande quando é utilizada a técnica de SSH (FOUCART et al., 2006). Esta técnica é capaz de identificar transcritos de novos genes a partir de bibliotecas de cDNA, devido enriquecer transcritos raros (DIATCHENKO et al., 1996; VILAINE et al., 2003). Assim, a identificação de seqüências sem homologia com as depositadas no banco de dados, representa uma valiosa fonte de informação genética, pois estas podem representar fragmentos de novos genes que controlam a tolerância do feijão ao frio. Tais seqüências precisam ser melhor estudadas a fim de descobrir quais proteínas e rotas metabólicas estão relacionadas e assim, obter um resultado mais consistente.

A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada em estudos de mecanismos de tolerância (SHINOZAKI e YAMAGUCHI, 1996), e depois de elucidado como funcionam, poderão dar origem a iniciadores. Marcadores moleculares obtidos a partir de bibliotecas de cDNA são bastante informativos e permitem reconhecer a associação da marca com a sua potencial função tornando-os valiosos nas análises genéticas (ALVARENGA, 2007). No entanto a possibilidades de sucesso na confecção de marcadores provenientes de fragmentos de cDNA dependem do número de genes envolvidos na tolerância do feijão ao frio, bem como, a distribuição destes genes no genoma, reafirmando a necessidade de estudos mais aprofundados nas seqüências diferencialmente expressas identificadas após o seqüenciamento da biblioteca de cDNA do genótipo IAPAR 81.

CONCLUSÕES

A técnica da SSH foi eficiente no isolamento de fragmentos de genes diferencialmente expressos em resposta a baixa temperatura no período da germinação.

Foram construídas duas bibliotecas de cDNA após a SSH e seu seqüenciamento possibilitou a identificação de seqüências diferencialmente expressas ainda não catalogadas no banco de dados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do feijão tem grande importância para a região Sul do país, no entanto poucas cultivares foram desenvolvidas visando exclusivamente seu cultivo nesta região. Cultivares adaptadas a baixas temperaturas no período da germinação são fundamentais, visto que na grande maioria destas regiões a semeadura é realizada em período que ainda há grande risco de ocorrência de baixas temperaturas.

O estresse por frio prejudica as lavouras de feijão, pois sementes de genótipos sensíveis não estabelecem plantas no campo, diminuindo o estande da lavoura. Porém, existem genótipos de constituições genéticas favoráveis que possuem tolerância a esta condição de estresse apresentando habilidade de germinar e sobreviver neste ambiente adverso. Genótipos tolerantes são valiosos para os programas de melhoramento vegetal, pois ao serem introduzidos em blocos de cruzamentos podem transmitir a sua descendência esta capacidade. O estudo e a prospecção dos genes que controlam a tolerância do feijão as baixas temperaturas via ferramentas da biotecnologia como transformação genética e a seleção assistida por marcadores, podem auxiliar o lançamento de cultivares tolerantes, diminuindo assim os prejuízos causados pelo frio.

A mineração destes genes de tolerância requer inicialmente a identificação de genótipos que possuam tal característica, para então, investigar molecularmente os processos que ocorrem e desencadeiam esta reação de sobrevivência após a indução do estresse. Desta forma, a construção e seqüenciamento de bibliotecas de cDNAs diferencialmente expressos do genótipo de feijão tolerante ao frio na germinação, é uma maneira eficaz de identificar os transcritos de interesse.

Sendo assim, neste trabalho foi possível identificar genótipos de feijão tolerantes as baixas temperaturas no período da germinação, bem como, obter transcritos diferencialmente expressos no genótipo tolerante após a indução do estresse via SSH, construção e seqüenciamento da biblioteca de cDNA. Foram encontradas também seqüências inéditas, as quais ainda não foram descritas no banco de dados, mas que, no entanto, necessitam ser mais bem estudadas para compreender intimamente as rotas metabólicas responsáveis pela tolerância ao frio, e assim futuramente desenvolver iniciadores para seleção indireta de genótipos tolerantes as baixas temperaturas.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, S.M. Caracterização de seqüências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças. Dissertação de mestrado. Viçosa, MG, p.107, 2007.

ALVES, A.A., SANTOS, J.B. dos, SILVA, F.B., RAMALHO, M.A.P. Lavras, UFLA, Resumos do XVIII CICESAL/UFLA, junho de 2005.

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.

ANDRADE M.J.B. Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais: Embrapa Arroz e Feijão: Sistemas de Produção, No.6. ISSN 1679-8869 Versão eletrônica, Dezembro/2005

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

BERTOLDO, J. G. et al. Problemas relacionados com o uso de testes de comparação de médias em artigos científicos. **Biota**, v. 21, n. 2, p. 145-153, 2008.

BINOTTI, F.F.S.; HAGA, K.I.; CARDOSO, E.D.; ALVES, C.Z.; SÁ, M.E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.2 p. 247-254, 2008.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, MG, 2005, 969p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BRESOLIN, A.P.S.; CASTRO, C.M.; HERTER, F.G.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; PEREIRA, F.B.; VIEIRA, C.L.; BERTOLI, R.F. Tolerância ao frio do amendoim forrageiro. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1154-1157, 2008.

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**. 13(2):168-184, 2001.

CASTRO, G.S.A.; BOGIANI, J.C.; SILVA, M.G.; GAZOLA, E. ROSOLEM, C.A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1311-1318, 2008.

COIMBRA, J.L.M. BERTOLDO, J.B.; ELIAS H.T.;HEMP, S.; VALE, N.M.; TOALDO, D.; ROCHA F.; BARILI, L.D.; GARCIA, S.H.; GUIDOLIN, A.F.; KOPP, M.M. Mineração da interação genótipo x ambiente em *Phaseolus vulgaris* L. para o Estado de Santa Catarina. **Ciência Rural**, v.39, p.355-363, 2009.

CONAB. **Acompanhamento de safra Brasileira: Grãos, sétimo levantamento, Abril 2010**/Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, DF, 2010, 42p.

CORTNER, J.; WOODE 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**, Philadelphia, 1997.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: Methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, p.1-8, 2004.

CUSTÓDIO, CC, VIVAN, MR, NUNES, RCA., AGOSTINI, EAT. Tolerância Cruzada Induzida Por Choque Térmico Na Germinação De Semente De Feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p.131-143, 2009

DALL'AGNOL, M.; SCHEFFER, S.M.B.; NASCIMENTO, J.A.L.; SILVEIRA, C.A.M.; FISCHER, R.G. Produção de forragem de capim-elefante sob clima frio. Produção e seletividade Animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.425-432, 2005.

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. e 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.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de feijão.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 385p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2003, 203p.

FOUCART, C.; PAUX, E.; LADOUCE, N.; SAN-CLEMENTE, H.; GRIMA-PATTENATI, J.; SIVADON, P. Transcripts profiling of xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xulogenesis in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v.170, p.739-752, 2006.

FERRÃO, M.A.G.; VIEIRA, C.; CRUZ, C.D.; CARDOSO, A.A. Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1089-1098, 2002.

FREEMAN, W.M.; ROBERTSON, D.J.; VRANA, K.E. (2000). Fundamentals of DNA Hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, 29:1042-1055.

GAI, X.; LAL, S.; XING, L.; BRENDEL, V.; WALBOT, V. Gene discovery using the maize genome database ZmDB. **Nucleic Acids Res.** v. 28: p. 94–96, 2000.

GURSKAYA, N.G.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P.D.; KHASPEKOV, G.L.; LUKYANOV, K.A.; VAGNER, L.L.; ERMOLAEVA, O.D.; LUKYANOV, S.A. e 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. **Analytical Biochemistry**, v.240, p.90-97, 1996.

GROVER, A.; KAPOOR, A.; LAKSHMI, O.S.; AGARWAL, S.; SASHI, C.; KATIYAR, S.A.; AGARWAL, M.; DUBEY, H. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stresse responses. **Current Science**, v.80, n.2, p.206-216, 2001.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; LUCON, C.M.M.; TSAI, S.M. Resistência sistêmica adquirida em cafeiro 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.

HE, N.; LIU, H. & XU, X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**. 17, 121-128. 2004.

IPCC. **Climate change - the physical science basis: summary for policymakers.** IPCC, Geneva, 2007, 18p.

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, 2000.

JIANG, X.C.; GUO, X.H.; PAN, XL.; SONG, S.Q.. Construction and Differential Screening of a cDNA Library Specific to Osmotic Stress of *Haloxylon ammodendron* Seedlings. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 05, p. 527-532, 2004.

LONGEMAN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Anal. Biochem.**, v.163, p.16-20, 1987.

LYONS, J.M. Chilling injury in plants. **Annual Review of plant physiology**, 1973, 24, p. 445-466.

MA, X.B. e YANG, J.. An optimized preparation method to obtain high-quality RNA from dry sunflower seeds. **Genetics and Molecular Research**. v. 10 n. 01, p. 160-168, 2011. DOI 10.4238/vol10-1gmr979

MAGUIRRE, J.D. Speeds of germination aid selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; BINNECK, E.; PESKE, S.T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, p.07-13, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Editora FEALQ, Piracicaba, 2005, 495 p.

MARTINS, A.F.; VIEIRA, E.A.; KOPP, M.M.; LUZ, V.K.; CARVALHO, M.F.; BRANCO, J.S.C.; CRUZ, R.P.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Caracterização de famílias mutantes de Arroz para tolerância ao frio nos períodos vegetativo e reprodutivo. **Bragantia**, v.66, n.2, p.227-233, 2007.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; SOARES, R.C.; BALDIGA, R.F.; PESKE, F.B.; MORAES, D.M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.262-270, 2009.

NETO, N.B.M.; CUSTÓDIO, C.C.; GATTI, A.B.; PRIOLLI, M.R.; CARDOSO, V.J.M. Proline: use as an indicator of temperature stress in bean seeds. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, n.3, 330-337, 2004.

NOVAK, M.P.; GRUDEN, K.; BAEBLER, S.; STRES H.K.; MAJA KOVAC, M., MAARTEN JONGSMA^C, M.; MAJA RAVNIKAR, M.. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 67, p. 237-247, 2006.

RAMALHO, M.A.P.; SILVA, G.S.; DIAS, L.A.S. Genetic plant improvement and climate changes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, n.2, p.189-195, 2009.

RODRUGUES, 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, 120p.

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

SANTOS, P.R.; RUIZ, H.A.; NEVES, J.C.L.; ALMEIDA, E.F.; FREIRE, M.B.G.S.; FREIRE, F.J. Germinação, vigor e crescimento de cultivares de feijoeiro em soluções salinas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.13, p.882-889, 2009. Suplemento.

SAS. Statistical Analysis System. **Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. SAS Institute, Cary, 2002, 86p.

SILVA, F.G.; IANDOLINO, A.; AL-KAYAL, F.; BOHLMANN, M.C.; CUSHMAN, M.A.; LIM, H.; ERGUL, A.; FIGUEROA, R.; KABULOGLU, E.K.; OSBORNE, C.; ROWE, J.; TATTERSALL, E.; LESLIE, A.; XU, J.; BAEK, J.; CRAMER, G.R.; CUSHMAN, J.C.; COOK, D.R. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development compendium of gene expression during berry development. **Plant Physiology**, v.139, p.574-597. 2005.

SILVA, G.F.O.; MELO, P.G.S.; MELO, L.C.; BASSINELLO, P.B.; DEL PELOSO, J.M.; FARIA, L.C. Efficiency of methods for conducting segregating populations in the breeding of common beans for protein quality. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.8, p.149-154, 2008.

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, 2008, 71p.

STEINER, F.; JUNIOR, A.S.P.; DRANSKI, J.A.L.; ZOZ, T.; RHEINHEIMER, A.R. Germinação de sementes de rúcula sob diferentes temperaturas. **Scientia Agrária**, v.11, n.2, p.119-124, 2010.

TAJIMA, K. Factors and mechanism of chilling injury. In: MATSUO, T. et al. (Eds.) **Science of the Rice Plant: Physiology**. Tokio: Food and agricultural Policy Research Center, 1995, v. 2, p. 798-812

TROYER, A.F. Background of U.S. hybrid corn II: breeding, climate, and food. **Crop Science**, v.44, n.2, 370-380, 2004.

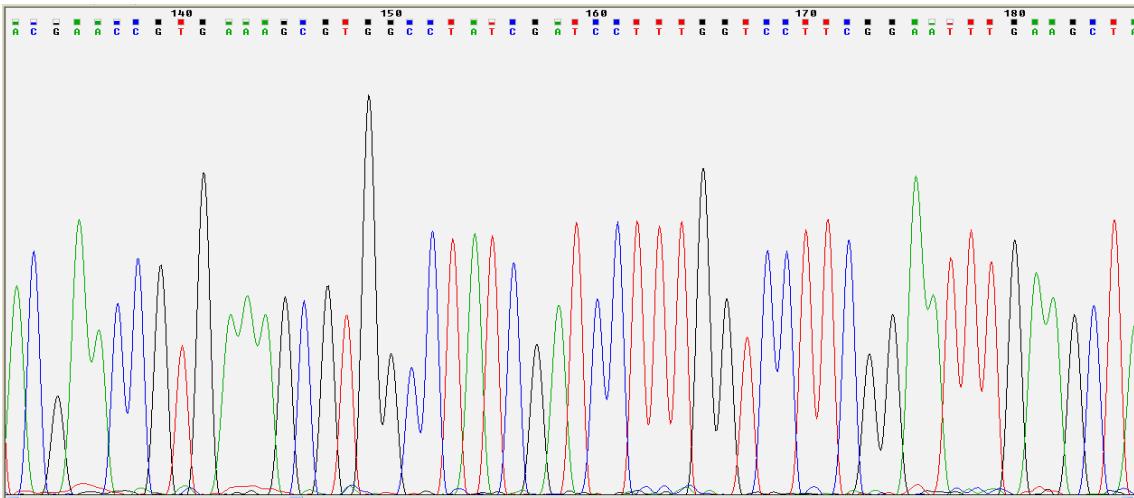
VILAINE, F.; PALAUQUI, J.C.; AMSELEM, J.; KUSIAK, C.; LEMOINE, R.; DINANT, S. Towards deciphering phloem: a transcriptome analysis of the phloem of *Aipium graveolens*. **Molecular Plant Journal**, v.36, p.67-81, 2003.

WINFREY, MR.; ROTT, M.A.; WORTMAN, A.T. **Unraveling DNA**. In: Molecular Biology for the Laboratory. Prentice-Hall, Uper Saddle River, NJ. 1997.

YOKOHAMA, S. Protein expression system for structural genomics and proteomic. *Curr.Opin. Chem. Biol.*, v.7, p.39-43, 2003.

ZHANG, Y. e STOMMEL, J.R.. Development of SCAR and CAPS markers linked to the beta gene in tomato. *Crop Sci.* v.41, p. 1602–1608, 2001

APÊNDICE



Apêndice 1. Perfil de um eletroferograma gerado a partir do sequenciamento automático de um fragmento diferencialmente expresso em feijão após estresse por baixa temperatura.

Apêndice 2. Identificação dos 105 clones de cDNA seqüenciados contendo fragmentos diferencialmente expressos em genótipo de feijão submetidos ao estresse por baixa temperatura. Seqüência de nucleotídeos obtidos, número de clones encontrados iguais (NCI), acesso e descrição das seqüências homologas encontradas no GenBank e E value.

Seqüência de Nucleotídeos Obtidos	NCI	Referencias das seqüências do banco de dados		
		Acesso	E-value	Descrição
Seqüência 01: CGAGCGGCCGCCGGGCAGGTTACTGG AAATCAGAACGAGCTTTACCCCTTTGTTCC ACACGAGATTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGG ACACCTCGTTATCTTTAACAGATGTGCCGCCCA GCCAAACTCCCCACCTGACAATGTCTCCGCCGGA TCGACCGGCCGAAGCCGACCTGGGTCCAAAAGA GGGGCAGCGCCCCGCTCCGATTACGGAAATAAGTA AAATAACGTTAAAAGTAGTGGTATTCACCTTCGCT GTTTCCAGCTCCACTTATCCTACACCTCTCAAGTCA TTTCACAAAAGTCGGACTAGAGTCAAGCTAACAGGG TACCTCGGCCGCGACCACGCTA	11	AK286 061.1	7e- 171	<i>Glycine max</i> cDNA
Seqüência 02: AGGCCGCCGGGAGGAGGTACGA ATACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCT TTAGTCCTCGGAATTGAAGCTAGAGGTGTCA GAAAAGTTACCACAGGGATAACTGACTTGTGGC AGCCAAGCGTTCATAGCGACGTTGCTTTGAT CCTCGATGTGGCTCTCCTATCATTGTGAAGC AGAATTCACCAAGTGTGGATTGTTCACCCACC AATAGGGAACGTGAGCTGGTTAGACCGTCGT GAGACAGGTTAGTTACCTACTGATGACAGT GTCGCAATAGTAATTCAACCTAGTACCTCGGCC GCGACCACGCTA	9	XR_07 7798.1	9e- 150	<i>Vitis vinifera</i> RNA
Seqüência 03: ATGCGTGGTGCCCGAGGTACGAA TACGAACCGTGAAAGCGTGGCCTATCGATCCT TAGTCCTCGGAATTGAAGCTAGAGGTGTCA AAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTGTGGCA GCCAAGCGTTCATAGCGACGTTGCTTTGATC CTTCGATGTGGCTCTCCTATCATTGTGAAGCA GAATTCACCAAGTGTGGATTGTTCACCCACC ATAGGGAACGTGAGCTGGATTAGACCGTCGT GAGACAGGTTAGTTACCTACTGATGACAGT GTCGCAATAGTAATTCAACCTAGTACGAGAGGA ACCGTTGATTGCACAATTGGACATCGCGTTG GTTGAAAAGCCAGTGGCGCGAAGCTACCGTGC GTTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAA TCCGGGCTAGAAGCGATGCGTGCGCCGCCGTT TGTTTGGCGACCAGCAGTAGGGGGCCTGGGCC CCCAGAGGCACGTGCCGTTGGTGACCCTCGTAA GGTGAATCAGCCTGCGAGACGCC	5	AM457 233.2	9e- 150	<i>Vitis vinifera</i> contig
Seqüência 04: CGAGCGGCCGCCGGGCAGGTTGT ACAAGCTTTTTTTTTTTTTCTTTTG GTAGAACATCTCGTCACTTAATTACGCTTCTATT CAATACGAAACATATAAATATTGAATAATGA	5	EU036 356.1	0,0	<i>Glycine max</i> clone do gene da proteína putativa SN003
		DQ886 273.1	0,0	<i>P. vulgaris</i> cv. Negro cloroplasto Jamapa,

AGTATCTTGTATTCAGCTCAATCCTTCTTTAG GAAAAGATTGTGCCAGTTAATTGCAATTAAAT CCAAAGTATCCATTGCTTCGAATTCAAATTGA TCTCCTTCCATACTTCGCAAGCAGCAGCTAATT CAGGACTCCATTGCTAGCCTCACGGATAATT CATTACCTTCACGAGCAAGATCGCGTCCTTCAT TTCGAGCCTGCACACATGCTTCAAGAGACTACTC GATTAGCTACAGCACCTGGTGCATTCCCAAG GGTGTCTAAAGTTCCCTCCGCCAAATTGAAGTA CCTCGGCCGCGACCAACGCTA		EU288 941.1	1e- 104	genoma completo <i>P. vulgaris</i> cv. PV02 NTU- parcial; cloroplasto
Seqüência 05: CGAGCGGCCGCCGGAGGTACGAG AGGAACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCGCG CTTGGTTGAAAAGCCAGTGGCGCGAAGCTACCG TGCCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCA GAATCCGGCTAGAAGCGATGCGTGCGCCCGC CGTTGTTGCCGACCAGCAGTAGGGGGCCTG GCCCCAGAGGCACGTGCCGTTGGTACCCCTC GTAAGGTGAATCAGCCTGCGAGACGCCTGAA GCGCAATTCCCATCGAGCGGCCGGTAGAATCCT TTGCAGACGAATCAAAGCGACAAGGGCTGAAT CTCAGTGGATCGTGGCAGCAAGGCCACTCTGCC ACTTACAATACCCGTCACGTATTAAGACCTC GGCGCGACCAACGCTAA	10	AK286 061.1	3e- 125	<i>Glycine max</i> cDNA, clone
		EU036 356.1	3e- 125	<i>Glycine max</i> clone SN003 putative senescence- associated protein gene
Seqüência 06: ATCGTGGTCGCCGGAGGTGCG ACGTGCTTTGATCCTTCGATGTCGGCTCTTC CTATCATTGTGAAGCAGAATTACCAAGTGTG GATTGTTACCCACCAATAGGAACGTGAGCTG GGATTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTAC CCTACTGATGACAGTGTGCAATAGTAATTCAA CCTAGTACGAGAGGAACCGTTGACTCGCACAAT TGGTCATCGCGCTTGGTTGAAAAGCCAGTGGCG CGAAGCTACCGTGCCTGGATTATGACTGAACG CCTCTAACGTACAATCCGGCTAGAACGCGATGC GTGCGCCGCCGTTGCTGCCGACCGAGCAGTA GGGGCCTTGGCCCCCAGAGGCACGTGCCGTT GGTACCCCTCGTAAGGTGAATCAGCCTGCGAG ACGCCTGAAGCGAAATTCCCATCGAGCGCCGG GTAGAACCTTGCACCTCGGCCGCGACCAACGC	4	EU036 356.1	0,0	<i>Glycine max</i> clone SN003 putative senescence- associated protein gene
		DQ465 790.1	0,0	<i>Sesbania</i> <i>drummondii</i> clone SSH- 37_ 01_A03_T3
Seqüência 07: AGAGCGGCCGCCGGCAGGTACA CCAGGGGAAGTTCATTTCTGGTGCTCAGC CACATCCTCATCGCTGCTTACTGAGGAAGTAG CTATCCTTAATGACTACTTGGAAACTTGGAT CAGGCAGCATGGCTTCATTATGGTAGCCCGG ACAAAAAGCAGAAATGGCATATCTACTCTGCAT CTGCTGATCCTCTAACATCTCATCTGATACCAATGT TTGTACCTGCCGGCGGCCGCTCGAAA	3	AY327 898.1	7e- 105	<i>P. vulgaris</i> e <i>P. lunatus</i> S- adenosyl methionine decarboxylase
Seqüência 08: GGCAGGTACAGCATTACTTAT GTGGCTCTTCACACATCCTCCAAGACCAGCCC CACACGTCGATCTAAACCATCCACGTTTCGT CTCATCATGGAACAGTTGCAGAACTTCTTTT	3	AB062 360.1	7e-95	Não há similaridade

CTTCATCGCTCTGGACCGTGTGATTAGTTCAA CTTCATAATCATCATCATTATCACCACCGATATC ACACTCATCGGACACGTGACAGGTTACCTCGGC CGCGACCACGCTAA				
Seqüência 09: GAGGTACTGGAAATCAGAATCAAA CGAGCTTTACCCCTTTGTTCCACACGAGATTTC TGTTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTCGGT TATCTTTAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAAC TCCCCACCTGACAATGTCTCCGCCGGATCGA CCGGCCGAAGCCGACCTGGGTCAAAAAGAG GGGCAGCGCCCCGCTTCCGATTCACGGAATAAG TAAAATAACGTTAAAAGTAGTGGTATTCACTT TCGCTGTTCCAGCTCCACTTATCCTACACCTC TCAAGTCATTCACAAAGTCGGACTAGAGTCAA GCTCAACAGGGTCTTCTTCCCCGCTGATTCCGC CAAGCCCCTTGGCTGTGGTTCGCTGG TAGTAGACAGGGACAGTGGGAATCTCGTTAAC CATTGCGCGTGACCTCGGCCGACACGC TAA	4	AK286 061.1 DQ465 773.1	1e-92 6e-91	<i>Glycine max</i> cDNA, clone <i>Sesbania drummondii</i> clone SSH - 20_01_E03_ T3
Seqüência 10: GAGGTACTGGAAATCAGAATCAAA CGAGCTTTACCCCTTTGTTCCACACGAGATTTC TGTTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTCGGT TATCTTTAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAAC TCCCCACCTGACAATGTCTCCGCCGGATCGA CCGGCCGAAGCCGACCTACCTGCCCCGGCGGCC GCTCGATTGCGACACTGTCATCAGTAGGGTAAA ACTAACCTGTCTCACGACGGTCTAACCCAGCT CACGTTCCCTATTGGTGGATTCTACCCGCCGC TCGATGGGAATTGCGCTCAAGGCCTCGCAA GGCTGATTCACCTACGAGGGTCACCAACGGCA CGTGCCTCTGGGGGGCAAGGGCCCCCTACTGCT GGTCGGCAAACAAACGGCGGGCGCACGCATCG CTTAGCCCCGGATTCTGACTTAGAGGGCGTTCA GTCATAATCCAACGCACGGTAGCTCGCGCCAC TGGCTT	3	X6108 2.1 AK286 061.1	2e-87 7e-93	<i>V.angustifolia</i> 25S/18S rRNA intergenic spacer DNA <i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21- C10
Seqüência 11: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTCTGC AAAGATTCTACCCGCCGCTCGATGGGAATTGCG CTTCAAGGCCTCGCAAGGCTGATTCACCTA CGAGGGTCACCAACGGCACGTGCCTCTGGGG GCCAAGGGCCCCCTACTGCTGGCGCAAACAAA CGGCGGGCGACGCATCGCTTAGCCCGGATT CTGACTTAGAGGCCTCAGTCATAATCCAACGC ACGGTAGCTCGCGCCACTGGCTTCAACCAA GCGCGATGACCAATTGTGCGAATCAACGGTTCC TCTCGTACCTCGGCCGCGACACGCTA	4	EU036 356.1	5e-122	<i>Glycine max</i> clone SN003 putative senescence- associated protein gene, partial cds
Seqüência 12: GAGGTGACGTTGCTTTGATCCT TCGATGTCGGCTCTCCTATCATTGTGAAGCAG AATTCAACCAAGTGTGGATTGTTCACCCACCAA TAGGGAACGTGAGCTGGATTAGACCGTCGTG AGACAGGTTAGTTACCCACTGATGACAGTG	3	EU036 356.1	0,0	<i>Glycine max</i> clone SN003 putative senescence- associated

TCGCAATAGTAATTCAACCTAGTACGAGAGGAA CCGTTGACTCGCACATTGGTCATCGCGCTTGG TTGAAAAGCCAGTGGCGCGAACGCTACCGTGCCTG TGGATTATGACTGAACGCCTCTAACAGTCAGAACATC CGGGCTAGAACGATGCGTGCCTGGCGTTG TTTGCCTGGCAGCAGTAGGGGGCCTGGCCCC CAGAGGCACGTGCCGGTGGTGAACCGCTCGTAAGG TGAATCAGCCTTGCAGACGCCTGAAGCGCAA TTCCCATCGAGCGGCGGGTAGAATCCTTGCAC CTCGGCCGCGACCACGCTAA				protein gene, partial cds
Seqüência 13: GAGGTACTATATTAATTAACCAATTCAATTCA AAATGTTGAAACAGAACGAAATAGAACAAATA AATGTCTAACACACCACATAAACAGAAACAAA CGCCATAGAGACATTACGAAAATACCACAAAA GAAAAAAACAAATAACTTGCCTGGAAACCGAGA CTTATTACAAAGACAAACGGTTCATACAAACACG TAAACTACTCTTCTTCAACTTCATCTTCCAGCA CTTCAGAGTTGATCTAGGTGAAACACAGTCACT AATCTTACGAATTTTGGTAAACAACAAACACC ACCCATTCCAAGGCCCTCGTGGATCCACTCTTC ACGACAGTATCCCTCACATCGACAAACACAT TTGTTAGAGGGCTTGCTGCAACCTCGGCCGC GACCACG	4	AY327 898.1	6e-38	<i>P. vulgaris</i> S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) genes
Seqüência 14: GGCAGGTACGAGAGGAACCGTTGA TTCGCACAATTGGTCATCGCGCTTGGTTGAAAA GCCAGTGGCGCGAACGCTACCGTGCCTGGATT TGACTGAACGCCTCTAACAGTCAGAACATCCGGCTA GAAGCGATGCGTGCGCCGCCGTTGTTGCCG ACCAGCAGTAGGGGGCCTGGCCCCCAGAGG CACGTGCCGGTGGTGAACCTCGTAAGGTGAATC AGCCTTGCAGACGCCTGAAGCGCAATTCCA TCGAGCGGCCGGTAGAATCCTTACCTCGGCCG CGACCACGCTA	2	AK286 061.1 EU036 356.1	AK286 061.1 EU036 356.1	<i>Glycine max</i> cDNA, clone <i>Glycine max</i> clone SN003 senescence associated protein gene
Seqüência 15: AGCGTGGTCGCCGCCAGGTACGAA TACGAACCGTGAAAGCGTGGCTATCGATCCTT TAGTCCTTCGGAATTGAAGCTAGAGGTGTCAG AAAAGTTACACAGGGATAACTGGGACGACTT AAATACCGACGGGTATTGTAAGTGGCAGAG TGGCCTGCTGCCACGATCCACTGAGATTCA CCTTGTGCTTGATTGCTCTGCAAAGGATTCTA CCTGCCGGCGGCCGCTCGATGGGAATTGCGC TTCAAGGCGTCTCGCAAGGCTGATTACCA CGGCCGCCGACCAACGCTA	1	AK286 061.1	5e-42	<i>Glycine max</i> cDNA, clone
Seqüência 16: ATGCGTGGTCGCCGCCAGGTACG CAAAACAAAAATAAAAATAAAAATTAGT AGACTGAAATCAGAACAAACGGGCTTTAC CTTTGTTCCACACGAGATTCTGTTCTGTTGA GCTCATCTAGGACACCTCGCTATCTTTAAC GATGTGCCGCCAGCCAAACTCCCCACCTGAC AATGTCTCCGCCGGATCGACCGGCCGAAGCC	3	AK286 061.1	0,0	<i>Glycine max</i> cDNA, clone: GMFL01-21-C10

GACCTTGGGTCCAAAAGAGGGGCAGCGCCCC GCTTCCGATTACCGAATAAGTAAAATAACGTT AAAAGTAGTGGTATTCACTTCGCTGTTCCA GCTCCCACTTACCTACACCTCTCAAGTCATTTC ACAAAGTCGGACTAGAGTCAAGCTCAACAGGG TCTTCTTCCCCGCTGATTCCGCCAAGCCCGTTC CCTTGGCTGTGGTTCGCTGGATAGTAGACAGG GACAGTGGGAATCTCGTTAACCCATTGCGC GTCACTAATTAGATGACGAGGCATTGGCTACC TTAAGAGAGTCATAGTTACTCCGCCGTTACC CGC		DQ465 773.1	0,0	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH- 20_01 _E03_T3
Seqüência 17: GAGGTACCACAGCCAAGCGAACGG GCTTGGCGGAATCAGCGGGAAAGAACGACCT GTTGAGCTTGACTCTAGGCCGACTTGTGAAAT GACTTGAGAGGTGAGGATAAGTGGGAGCTGG AAACAGCGAAAGTGAATACCACTACTTTAAC GTTATTTACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGG GCGCTGCCCTCTTTGGACCCAAGGTCGGCT TCGGCCGGTCGATCCGGCGGAAGACATTGTCG AGGTGGGGAGTTGGCTGGCGCGCATCTGT TAAAAGATAACGCAGGTGTCCTAACGATGAGCTC AACGAGAACAGAAATCTCGTGTGGAACAAAAG GGTAAAAGCTCGTTGATTCTGATTCCAGTAA	2	DQ465 789.1	0,0	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH- 36_01_A09_ T3
		AK286 061.1	0,0	<i>Glycine max</i> cDNA, clone
Seqüência 18: GAGGTACACAAGTTGTGGTCAAA CTCTGCCAAATCTACAGACCCCTGATTCAATTGG TGGCATTAAATATGCAGCCAAGAGATTCAGACAC CAAAGCAGCAACCAGTGGAAATCCTCTTAAGTT CTTCACCAACTGTAGGTCACTCACTCTACCAAT AGCAAGAACATCTCTGGTTATCTCCACCATCCT GTCCAACCTCCCTCTGAATTCTGGGTTTCAACA TCAAGAACAGCAGGGAAAATCCGAGGCCGTTGT GCGGTTGTCTCAATGATGACATGCATGTCAAA TTCTTTGTGTTAACGATCCAATTCTTCATAGAAA TCCGTACGTTGCAATCATTGAGATACATAGTG ACATAAACCGAGAGACAGAACAGCGAGACCA CAACTTGCCTCCAATCGTTAGAAATTGTGG CTGTGCCCTCATAAAGGGCAGAGAAAAAAATCTCC ATGCCTGTTCTCATCCTGGCACCAAGTCTCAAA GTACCTCGGCCGACACACGC	1	FN178 671.1	2e-59	<i>P. vulgaris</i> partial comparative anchor tagged sequence candidate Leg092, variety BAT93 x Jalo EEP558
Seqüência 19: GAGGTGAAGCAGCAACAATTAGTC TCAGCTGAAAATGGCCTCCTCAGTGATGGCATC TGTGGCCCTTAAACCTGCCCTTCACTGTTGAG AACTCCTCAGTGAGAGGGCTCCCTCCCTCTCA AGAAACTCCTCTTCATTCAAGAGTTGTGGCCAGT GGTGGCAAGAACGACTGACACACACCTTA TGGAATCAGTGGTGGCATGAACCTGAGGGATG GAGTTGATGCATCTGGCAGGAAAGGAAAGGGA AGGGTGTGTACCTGCCGGCGCGCTCGA		AK287 075.1	2e- 101	<i>Glycine max</i> cDNA, clone
Seqüência 20: AGCGTGGTCGCCGCCAGGTACGT GCACATCAATCAGGCCAGGCATAACAACAGCA	3	-	-	Similaridade não

TCTCCATAATCTATTATTTCTTCTTGTAGACT GCCCTGCTTACCATATCCCTCAATGACAGATA CTATTCTCCCTTCATTATCTCCACTGAACCAGA AATGGTCCCCTGTGGGGTCACAATGCCGGTGT GGATATCCAGAAGTGGTGTGGAAAGAAGGC TGCACCTACTCCGTGGAAACTTATGAGAGGAT ATAACTGGGCCGTGTGAATTCTGGAAGTAGA AGAATACCAAAAAGGAAACAAGGATTGATAGC AAAGGCAACACCCCTCCAGATAAACTGATCCATT TCACACCTGCCGGCGGCCGCTCGAA				encontrada	
Seqüência 21: AGGTACTGGACGATGTGGAAGCTG CCTATTTGGGTGCACTGATTCTCTCAGGTGT TGAAGGAGCTTACGAGGCTCAGACTGCTCACC CCGATGGTTCATCCGTATCATTGGATTGACA ACGTTCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTTCATTG CCTACAAGCCACCAGGCTACTAAGTCTCCAAA TTTCCCACTTGTTGTTGTACCTCGGCCGCGA CCACGCTA	4	X5999 9.1	1e- 106	<i>P.vulgaris</i> mRNA for small subunit of ribulose bisphosphate carboxylase/o xygenase	
Seqüência 22: GGCAGGTACAACATCTCCCATTCA TAGATCTGCGCCTACCTTATACAATTAGATAC AAAATTATCTATTTGAAACAGGAATAAAAGT AGTAGATCTTAGCTCCTTATCGTCGTTGGAGG AAAAATTGGACTTTCGGTGGAGCTGGAGTAGG TAAAACAGTACCTCGGCCGCGACCACGCTAA	3	DQ886 273.1	2e-78	<i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa chloroplast	
Seqüência 23: GGCAGGTACATGGAAAAGCACACA GTCTCGAGATTGATTGGGGCTCCACCTGGATAT GTTGGGTATGAAGAGGGAGGGCAACTAACAGA GACAGTTGCCCGCAGACCTTATGCTGTCACTTT GTTTGATGAGATTGAGAACAGGACACTCAGATGT TTTCAATGTATTCTTCAAATCCTGGATGATGG AAGAGTAACGTGATTCACAGGGCAGGACAGTAA GTTTACCAACACGGTTATCATTATGACCTCAA ATGTTGGATCACAGTGGCAGAGTGGCCTTGCTG CCACGATCCACTGAGATTCAAGCCCTTGTGCGCTT TGATTGCGCTGCAAAGGATTCTACCCGCCGCTC GATGGGAATTGCGCTTCAAGGCGTCTCGCAAGG CTGATTCAACCACCTCGGCCGCGACCACGCTAA	1	AK286 061.1	6e-23	<i>Glycine max</i> cDNA, clone	<i>Mung bean</i> 25S rRNA - 18S rDNA spacer region
Seqüência 24: CAGGTGGTCGCGGCCGAGGTGTTG ATTCTGATTCCAGGTACGAATACGAACCGTGA AAGCGTGGCTATCGATCCTTAGTCCTTCGGA ATTGAAACGCTAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCA CAGGGATAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTC ATAGCGACGTTGCTTTGATCCTCGATGTCGG CTCTCCTATCATTGTGAAGCAGAATTACCAA GTGTTGGATTGTTAGACCGCTGTGAGACAGGTTAG GAGCTGGGTTAGACCGCTGTGAGACAGGTTAG TTTACCTACTGATGACAGTGTGCGCAATAGTA ATTCAACCTAGTACCTCGGCCGCGACCACGCTA	1	AF223 066.1	2e- 157	<i>Humulus</i> <i>lupulus</i> 26S ribosomal, 18S ribosomal	<i>Vitis vinifera</i> misc_RNA
Seqüência 25: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACGA GCCTATAGAACAGATCCTGATTGTTTTATT	1	EU018 598.1	2e-13	<i>P.vulgaris</i> mRNA for	

TATTTGATTGATGACTGAAAGTTGATAGTTATGGTTATGCTCAATGAGGATTTTTGCAAGTTAATATCAAAACTTATATTTCACCAAGTTAATTTCCCCAAAAAAAGCTTGTACACATCGACCCACTGGTCATCTTGAGCAGCTGTAAGCCACTGACCTTGTACATCCTGGAAGAGAAGGATGATCCCACCGGCATCGGTGAGGGCACGAAGACCCCTCACCAACTCTGGTTGGGCATGGAGGGTAGTTGGCACCTGGTGCACAACTGGTGCACAAAGTTGGTCCTTGTACCCATAGAAGGCTTCTTGAGGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGATGTCTCCAAAATTCCCACTTGTTTGTTGTACCTCGGCCGACCGCTAA		NM_124786.4	0.002	small subunit of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase <i>Arabidopsis thaliana</i> heat stress transcription factor A-9
Seqüência 26: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACTGGAAATCAGAACAAACGAGCTTTACCCCTTGTTCACACGAGATTCTGTTCTCGTTGAGCTATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTAAACAGATGTCGGCCCCAGCCAAACTCCCCACCTGACAATGTCCTCCGCCCCGGATCGACCGGCCGAAGCCGACCACTTGCCCACGGTATTAGCAAGGGCATTAAACATAACCATGGTATCGCAAAATATTGTAACAATTGATCCAGGATGAAGGCAGTTAACAGTTATTCCACTCCTCTCCTCAAGCGCCTGCAAGCTCCTTGCATGCAAAATGTTAGCGAGTTGATTGTCCAATAGCAAAATACTGCTGTACCTCGGCCGCGACACGCT	1	DQ465 789.1 BT097 335.1	4e-79 1e-79	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH-mRNA <i>Soy bean</i> clone JCVI-FLGm-26K19 unknown mRNA
Seqüência 27: AGCCGGGTCGCGGCCGAGGTACAGCAATGTCTAACCTCCAAAAAAATAGTCTACAAGTTAAGTTGTATCAATTAAACCCCTTCTCTGGTCATCTATGGTGTCCAATTCCAGGAGATGCATTGTCACTGCACGAACCTCTGTCATTCTAGTATCTCAAGTGCAGGAGAGAAACATCTCAAGTTGATGCTGCATCTAAATATGTTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCGA	2	-	-	Homologia não encontrada
Seqüência 28: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACAAAGAACGGCAAATCTTATGGTTATATCGGAA GACATGGAAAGGGATGTTTATGTCAGCAGCA GAAGCCCAAGCTTATGGAATTGTAGATCTTGTAGCAGTTGAATAAAAATCGGTGGCAAGATTGATTCTACTAAAATACAGGATTGAAATTCTTACATTTCAGAGAAATATCTCTCAATCTATTAAATAGAGTATCAATAATATA GGCTATCAGTAAGATAGGATATAGGTAATTCACGGTTAGGATAGATCTAACCTGCTCATTATACC AAAATCTATATATATAGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCG	1	EU196 765.1 DQ886 273.1	5e-167 5e-167	<i>P. vulgaris</i> chloroplast, complete genome <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa chloroplast.
Seqüência 29: CGGCCGCCGGGCAGGTACATTAGATAGGAGAAATCTTAGGGAACCAAGATGAGGTCATTGATAATGGTTGATGTTCATACGGAGAAAGAGGATGCAAGGCCAAAGTTAAGGCCAGAGCTAAAAGATCCCTAACAAAGTCATAGTATC	1	FJ8172 91.1 AK243	3e-82 3e-62	<i>P. vulgaris</i> clone BAC B4-410 <i>Glycine max</i>

CTCCTTCAGTGCCAGTGTGTTTCACCAACCTC GGCGCGACCAACGCTAA		989.1		cDNA, clone
Seqüência 30: AGCGTGGTCGCCGGCGAGGTGAAA CAGCGAAAGTGAATACCACTACTTTAACGTT ATTTTACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGCG CTGCCCTCTTTGGACCCAAGGTGGCTTCG GCCGGTCGATCCGGCGGAAGACATTGTAGGGT GGGGAGTTGGCTGGCGGCACATCTGTTAAA AGATAACGCAGGTGTCTAACAGATGAGCTAAC GAGAACAGAAATCTCGTGTGGAACAAAAGGGT AAAAGCTCGTTGATTCTGATTCCAGTACCTG CCCGGGCGGCCGCTCGATGTACAGTAGGGTA AA	1	AK286 061.1 DQ465 789.1	1e- 132 6e- 131	<i>Glycine max</i> cDNA, clone <i>Sesbania</i> <i>drummondii</i> clone SSH
Seqüência 31: CGAGCGGCCGCCGGCAGGTACA ACATCTCCCATTAGATCTGCGCCTACCTTA TACAATTAGATACAAAATTATCTATTTTGAAA CAGGAATAAAAGTAGTAGATCTTAGCTCCTT ATCGTCGTGGAGGAAAAATTGGACTTCGGTG GAGCTGGAGTAGGTAAAACAGTACCTCGGCCG CGACCACGCTAA	1	EU196 765.1 DQ886 273.1	2e-78 2e-78	<i>P. vulgaris</i> chloroplast <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa chloroplast
Seqüência 32: CGAGCGGCCGCCGGCAGGTGT ACAAGCTTTTTTTTTTTTTCTTTG GTAGAATCTCGTCTACTTAATTACGCTCTATT CAATACGAAACATATAAATATTGAATAATGA AGTATCTTGTATTAGCTCAATCCTCTTTAG GAAAAGATTGTGCCAGTTAATTGCAATTAAAT CCAAAGTATCCATTGCTCGAACATTAAATTGA TCTCCTCCATACTCGCAAGCAGCAGCTAATT CAGGACTCCATTGCTAGCCTCACGGATAATT CATTACCTTCACGAGCAAGATCGCGTCCTTCAT TTCGAGCCTGCACACATGCTCAAGAGAGCTACTC GATTAGCTACAGCACCTGGTGCATTCCCAAG GGTGTCTAAAGTTCCCGCCAAATTGAAGTA CCTCGGGCGCGACCAACGCT	1	EU196 765.1 DQ886 273.1	0.0 0.0	<i>P. vulgaris</i> chloroplast <i>P. vulgaris.</i> cv Negro Jamapa chloroplast
Seqüência 33: CGAGCGGCCGCCGGCAGGTGCC TCGTCTAATTAGTGAACGCGCATGAATGGAT TAACGAGATTCCCACTGTCCTGTCTACTATCC AGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGCTGGC GGAATCAGCGGGAAAGAACAGACCCCTGTTGAGC TTGACTCTAGTCGACTTGTGAAATGACTTGA GAGGTGTAGGATAAGTGGAGCTGGAAACAGC GAAAGTGAATACCAACTACTTTAACGTTATT TACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGCGCTGC CCCTCTTTGGACCCAAGGTGGCTTCGGCCG GTCGATCCGGCGGAAGACATTGTCAAGGTGGG GAGTTGGCTGGCGGCACATCTGTTAAAAGA TAACGCAGGTGTCTAACAGATGAGCTAACGAG AACAGAAAATCTCGTGTGGAACAAAAGGGTAAA AGCTCGTTGATTCTGATTCCAGTACCTCGGCC GCGACCACGCTA	1	AK286 061.1 DQ465 789.1	0.0 0.0	<i>Glycine max</i> cDNA, clone <i>Sesbania</i> <i>drummondii</i> clone SSH

Seqüência 34: GGGTCGCGGCCGAGGTCTGACTCTAGTCCGACTTGTGAAATGACTTGAGAGGTGTAGGATAAGTGGGAGCTGGAAACAGCGAAAGTGAATACCAACTACTTTAACGTTATTACTTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGCGCTGCCCTTTTGGACCCAAGGTCGGCTCGGCCGGTCGATCCGGCGGAAGACATTGTCAGGTGGGAGTTGGCTAAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTGAGAATTCACCAATAGGGAACTGAGCTGGTTAGACCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTACCTACTGATGACAGTGTGCAATA GTAATTCAACCTAGTACGAGAGGAACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCGCGCTGGTTGAAAAGCCAGTGGCGCGAAGCTACCGTGCCTGGATTATGACTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCGGCTAGAAGCGATGCGTGCGCCGCGTTGTTGCCGACAAGCAGTAGGGGCCCTGGCCCCCAGAGGCACGTGCCGTTGGTACCCCTG	1	AK286 061.1	2e-159	<i>Glycine max</i> cDNA, clone
Seqüência 35: AGCTGGTCGCGGCCGAGGTACCCCTCAACAAACCCCATCAGCACAAACCTGAACAGCC CAGATGGCAAGAATGCTCTGAGCATGGACAGGTTGGTTCCCAAATAGTCAAGCCCTCCCTCAGAGAAGATCTGTGCACCAGCCTGAACCACAC TGCCTCACCGAATTTCACACCATTCTCTCAAGGATCTGGGAAGGTGCATCCCAGAGCACCAGA GATCTCTGGGAAGGTGCATCCCAGAGCACCAGA GCATGGCCCATCTGCTGTGAATCACCTCCAAGTGGTTTCAGGGTCAGCTG CACGGTCCTGGCAAAGGTTTCAGGGTCAGCTGATAATCCAGCTGTGCCCATTCCGTAGTCACCAG GGAATTCAACCAAGTCAGGTATGATGGAATCTGCTCAGAGAATGGTCCCAAGTACTTGGGACGGTCA GGGCCATACCAAGATGCTCTGAGGGAGCACTTTGACGGTGTACCTCGTTCTGTCTACACTGTCTCTCTGCCACTGATCCTAAAGAGGAACGCTAGGGAC TCCCATGTTCTGTACCTGCCGGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGAACGTC	1	AF279 248.1	0.0	Vigna radiata LHCII type II chlorophyll a/b-binding protein; nuclear gene for chloroplast product
Seqüência 36: CGAGCGGCCGCCGGCAGGTGCGACGGGTATTGTAAGTGGCAGAGTGGCCTTGCTGCCACGATCCACTGAGATTCAAGCCCTGTCGCTTTGATTGCTCTGCAAAGGATTCTACCCGCCGCTCGATGGGAATTGCGCTTCAAGGGCGTCTCGCAAGGCTGATTCACCTACGAGGGTCACCAACGGCACGTGCCTCTGGGGGCCAAGGCCCCCTACTGCTGGCGCAAACAAACGGCGGGCGCACGCATCGCTCTAGCCGGATTCTGACTTAGAGGGCGTTAGTCATAATCCAACGCACGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTTCAACCAAGCGCGATGACCAATTGTGCGAATCAACGGTTCTCGTACCTGCCGGCGA	1	X1721 1.1	3e-110	<i>Mung bean</i> 25S rRNA - 18S rDNA spacer region
Seqüência 37: AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCC	1	AK286 061.1	3e-125	<i>Citrus limon</i>

TGATGAAATTCAATTCTGCATGGAACCCCTTAC TTAAACTCGAATGCAATTACATCTTAGTTTATC CTTAAACATGTCGGATTAGATACTAGAACGAA ATTGGTCATCTTATATGAAATAGAGGAGTAATT GATTCTGACAAAACAAAATTGTGAAACTTATGT GCTAGAACTGATGATCCTAATGACATTGAAC TG TGTCTTGAAACAGCCCTCAAGGACATGGTCG AAGGAATGAGGATGGACCTTAGGAAGTCAAGA TACGATAACTTGATGAGCTGTACCTGCCCGG		AB114 664.1	2e-12	CitPSY mRNA for phytoene synthase
Seqüência 38: AGCGTGGTCGCCGCCGAGGTGCC AGCGCAGAAAGTGAGTTAACGCCATGGCTGC AGATGCTTCTGTTTACCTTGGAGATGACGA AGACTACGAAAGTGATTGAACATACATCAATTG TTATCTTCATATTGGATTTGTACCTGCCCG	1	AP006 667.1	1e-25	<i>Lotus japonicus</i> genomic DNA
Seqüência 39: ATGCGTGGTCGCCGCCGAGGTACG GACAAGGGGAATCCGACTGTTAACCA AAGCATTGCGATGGCCCTGCCGGATGTTGACGC TTTGTGATTCTGCCAGTGCTCTGAATGTCAA GTGAAGAAATTCAACCAAGCGCCGGTAAACGG CGGGAGTAACATGACTCTTAAGGTAGCCAA ATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAA TGGATTAACGAGATTCCCACTGTCCTGTCTAC TATCCAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGC TTGGCGGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCCTGT TGAGCTGACTCTAGTCCGACTTGTGAAATGA CTTGAGAGGTGTAGGATAAGTGGGAGCTGGAA ACAGCGAAAGTGAAATACCAACTACTTTAACGT TATTTCACCTATTCCGTGAATCGGAAGCGGGGC GCTGCCCTCTTTGGACCCAAGGTGGCTTC GGCCGGTCGATCCGGCGGAAGACATTGTCAG GTGGGGAGTTGGCTGGGGCGG	1	DQ465 761.1	0.0	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH