



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – FAV

Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em amendoim silvestre

Amanda Kristina da Silva

Brasília – DF

Fevereiro de 2013



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAV

Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico em amendoim silvestre

Amanda Kristina da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Brasília – DF

Fevereiro de 2013

Trabalho de Conclusão de Curso da autoria de Amanda Kristina da Silva, intitulada “PROSPECÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES-CANDIDATOS ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM AMENDOIM SILVESTRE”, realizada junto a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília, e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Aprovado por:

Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Universidade de Brasília

Dra. Larissa Arrais Guimarães

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedicatória

À Deus, meus pais, João e Maria Lúcia, à minha família, ao Daniel e a todos meus amigos, dedico.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília por me oferecer um ensino de qualidade.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por disponibilizar infraestrutura e recursos para a realização deste trabalho

A coordenação e demais professores da Faculdade de Agronomia, que me proporcionam a oportunidade de me formar mais cedo, assim como a boa vontade de me ajudarem nos últimos dias.

A minha querida orientadora, Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro, por acreditar no meu potencial, assim como me apoiar ao longo dos quase quatro anos de estágio! Muito obrigada, pela ajuda, pelos ensinamentos, pela disposição, por me encorajar a seguir na área Pesquisa e principalmente, por me aceitar mesmo com todas minhas dificuldades.

À toda equipe do LPP3, Dra. Soraya, Dr. David, Dra. Patrícia, Dra. Ana Cláudia, Dra. Simone e Leonardo, por fazerem parte do meu dia a dia no laboratório.

À Dra. Carolina Morgante, por me ajudar no meu primeiro ano de estágio, assim como, me ensinar tarefas essenciais em um laboratório.

À Dra. Larissa Guimarães, pela prontidão no aceite do convite para participar da minha banca e pelos recentes ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Everaldo, por ser um excelente professor, por me apresentar o mundo do melhoramento, pelos conselhos e incentivo, principalmente, pela disponibilização do pouco tempo na execução do TCC e claro por ser torcedor também do meu time amado

Aos meus amigos do LPP3, Paulinha, Lari Muniz, Thaís, Aninha, Raquel, Kaká, Bruninha, Uíara, Igor, Karolzinha, Lorena, Liginha e Maurício, que são os melhores companheiros de trabalho, com certeza com a presença de vocês, qualquer ambiente de trabalho torna-se agradável. Sentirei falta dos nossos almoços e da alegria que vocês me proporcionam!

À Andressa Martins, por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, pelas milhares correções do TCC e pelas incansáveis ajudas, com certeza, sem você eu não teria ido tão longe! Por todas as madrugadas de qPCR, sem contar os finais de semana de extração de RNA. E acima de tudo, por ser minha amiga!

Aos meus amigos do coração, que estiveram presente ao longo de toda essa caminhada, vocês são indispensáveis! Bruno, meu irmão escolhido; Jessica, minha batalhadora; Mariana, meu coraçãozinho! E a mais recente, Estela, minha companheira de

Mestrado, que me aguentará durante todos os dias em Campinas! Muito obrigada pelo apoio! “Se tens um objetivo, lutes que Deus ilumina”. Amo vocês!

A todos os meus amigos de faculdade, especialmente, Ingrid, Yumi, Sara e Rodnei. Muito obrigada pela grande atuação de vocês durante a graduação.

Ao Daniel, meu companheiro, meu melhor amigo, meu amor, obrigada por me encorajar e me acompanhar durante esses extensos cinco anos! Por entender a ausência, por aturar meus chiquetes e estresses, muitos desnecessários. Te amo, gordo!

Ao meu pai, lindo, querido, idealizador dos meus sonhos, formador da minha identidade, meu referencial, minha fortaleza, meu exemplo e claro, meu herói! Dono das minhas risadas mais gostosas, da minha imensa vontade de vencer da vida! Muito obrigada por me escolher e exercer perfeitamente bem o papel de PAI! Toda minha conquista, dedico ao Sr.! Te amo, pai!

À minha mãe, querida, por todos os anos de dedicação a mim, por desistir dos seus sonhos para realizar os meus, por estar presente sempre quando necessário, e principalmente por ser uma batalhadora, um exemplo de coragem pra mim! Te amo, mãe!

À minha família linda, escolhida a dedo, às minhas Vózinhas lindas, Isa e Iraci, por todos os cuidados e experiência de vida! Ana Karina e Xande por todos os conselhos e apoio, vocês foram essenciais nessa jornada! Ana Flávia, Silvio, João e Flávio, pela torcida! Ana Paula, pela educação e pela companhia durante toda minha infância. Amo vocês!

E a Deus, pelo amor incondicional, pelas Palavras de tranquilidade e momentos de sensatez e conforto.

Vocês estarão sempre presentes em meu pensamento! Muito obrigada!

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Pontos de coleta do experimento. CTR - Controle; EST - Estressado; NTR - Taxa de transpiração normalizada. (*) Ponto de coleta após 30 minutos de reidratação; (**) Ponto de coleta após 72 horas de reidratação.....10

Tabela 2 - Primers desenhados para os genes-candidatos selecionados em *A. duranensis*..... 16

Lista de Figuras

Figura 1 - Produção (em milhões de toneladas/ano) das principais oleaginosas produzidas no mundo, nas safras de 2008 a 2012 (USDA-FAS, 2013).....	2
Figura 2 - Produção de amendoim no Brasil (em milhões de toneladas). Imagem adaptada aos dados contidos no relatório de Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos - Safra 2012/2013 (Martins, 2011; Conab, 2013).....	3
Figura 3 – Esquema ilustrativo do cruzamento eventual de duas espécies diploides (genoma AA+ genoma BB) de <i>Arachis</i> , gerando um híbrido estéril (Martins, 2011).....	4
Figura 4 - Plantas usadas no experimento de estresse hídrico. Visão geral das plantas em copos plásticos fechados com saco plástico para evitar perda de água por evaporação.....	10
Figura 5 - Evolução das TRs (Taxas de transpiração) e NTRs (Taxas de transpiração normalizada – linha verde) ao longo do experimento nos grupos de plantas controle (linha azul) e estressado (linha vermelha).....	10
Figura 6 - Gel de agarose (1,5%) de RNA total extraído de raízes de <i>A. duranensis</i> submetidas ao estresse hídrico. (M) Marcador molecular DNA1kb plus.....	15
Figura 7 - Gel de agarose (1,5%) do cDNA sintetizado a partir de amostras de raízes de <i>A. duranensis</i>	15
Figura 8 - Análise da quantificação relativa (RQ) por RT-qPCR para os 7 genes-candidatos, a partir da média obtida entre as replicatas biológicas de cada um dos pontos de coleta de raiz de <i>A. duranensis</i> . Os níveis relativos de mRNA (razão entre EST/CTR) estão representados por barras e o desvio-padrão das triplicatas pelas linhas verticais. Dados normalizados com os genes de referência <i>Actina</i> e <i>Ubiquitina</i> . (A) RQ de Citocromo P450; (B) RQ de Aquaporina; (C) RQ de Metiltransferase; (D) RQ de Metalotioneína; (E) RQ de Dehidrina; (F) RQ de Chaperona; (G) RQ de Esterase. (*) Ponto que foram significativamente regulados (positiva ou negativamente).....	17

Sumário

Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. O amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>).....	2
2.2. O gênero <i>Arachis</i>	3
2.3. O uso de espécies silvestres no melhoramento genético	4
2.4. <i>Arachis duranensis</i>	5
2.5. Estresse hídrico	5
2.6. Análise de expressão gênica.....	6
2.7. Pirosequenciamento.....	7
2.8. PCR quantitativo (RT-qPCR).....	7
3. Objetivos.....	8
3.1. Geral	8
3.2. Específicos.....	8
4. Material e Métodos	9
4.1. Ensaio <i>dry down</i>	9
4.2. Extração e análise qualitativa e quantitativa do RNA total	11
4.3. Síntese de cDNA.....	13
4.4. Desenho dos primers para os genes-candidatos selecionados	14
4.5. RT-qPCR	14
5. Resultados.....	15
5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	15
5.2. Análise da qualidade do cDNA.....	15
5.3. Escolha dos genes-candidatos.....	16
5.4. Validação dos genes-candidatos por RT-qPCR	16
6. Discussão	18

7. Conclusão.....	20
8. Referências Bibliográficas	22

Resumo

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma das leguminosas mais cultivadas no mundo devido ao seu alto valor energético. No entanto, a maioria das espécies domesticadas é suscetível a estresses bióticos e abióticos, resultando em perdas de produção. Em contrapartida, as espécies silvestres são fontes de genes relacionados à resistência a doenças e a adaptação a diferentes ambientes, que são características desejáveis e de importância econômica. Em particular, a espécie silvestre *Arachis duranensis* (acesso K7988) tem uma elevada capacidade de adaptação às condições de déficit hídrico. Visando a identificação de genes-candidatos associados à resposta ao déficit hídrico, folhas e raízes foram coletadas em sete pontos diferentes durante a indução do estresse: cinco pontos correspondentes a alterações no padrão de transpiração das plantas (NTR), e os outros dois, após 30 minutos e 72 horas de hidratação. O RNA total foi extraído e agrupado, para cada tratamento, utilizando-se quantidades iguais de RNA total de cada indivíduo de acordo com os pontos de coleta e tecido. Duas bibliotecas de cDNA de amostras estressada e controle foram construídas a partir de RNA total purificado e sequenciadas por pirosequenciamento, tecnologia em larga escala 454 (GS-FLX Titanium Kits Fragmento Series, Roche Applied Science), resultando em 380.601 genes transcritos (tamanho médio de 390pb) e 21.714 unigenes, dos quais 12.792 eram constituídos por *contigs*. Sete dos genes-candidatos mais representativos relacionados à resposta ao déficit hídrico foram selecionados para a validação por meio de RT-qPCR. Alguns desses genes mostraram uma regulação significativamente positiva ou negativa ao longo do estresse e após a reidratação. Toda a informação gerada será importante para a caracterização de genes silvestres, descoberta de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares.

Palavras-Chave: Amendoim, *Arachis duranensis*, déficit hídrico, genes-candidatos.

Abstract

The peanut, *Arachis hypogaea* is one of the most widely grown grain legumes in the world due to its high energy value. However, most of domesticated species are susceptible to biotic and abiotic stresses, resulting in production losses. Unlike, wild species are sources of genes related to disease resistance and adaptation to different environments, which are desirable traits of economic importance. In particular, the wild species *A. duranensis* (access K7988) has a high adaptability to water stress conditions. The aim of this study was to identify gene expression regulation in *A.duranensis* plants subjected to gradual water stress and its control irrigated plants. Leaves and roots were collected at seven different points of stress, when changes were observed in the pattern of plant transpiration, and after 30 minutes and 72 hours of rehydration. Total RNA was extracted and a pool was formed for each treatment, using equal amounts of total RNA from individuals in each collection point and for each tissue. Two cDNA libraries were constructed from total RNA purified from these pools and sequenced by pyrosequencing large scale technology 454 (GS-FLX Titanium Fragment Series Kits, Roche Applied Science), resulting in 380,601 expressed genes(average size of 390pb), which generated 21,714 unigenes, which consisted of 12,792 contigs. Seven of the most differentially expressed candidate genes related to hydricstress or abiotic stress were selected for validation through RT-qPCR. Some of these genes showed a significantly positive or negative regulation during stress and after rehydration. All information generated here will be important for the characterization of new wild genes, gene discovery and development of molecular markers

Keywords: Peanut, *Arachis duranensis*, hydric stress, candidate genes.

1. Introdução

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é a quarta oleaginosa mais produzida no mundo, quando diz respeito à sua qualidade nutricional e a potencialidade da mesma de se tornar presente na cadeia alimentar diária devido ao seu alto valor energético. De produção extensa, a cultura tem se tornado uma alternativa para o suprimento da demanda energética e proteica, justificando assim, a sua produção em diversos ambientes. Atualmente, a produção brasileira de amendoim concentra-se no Estado de São Paulo, com mais de 80% da produção nacional (Conab, 2013).

Como qualquer outra planta, em condições naturais e agricultáveis, o amendoim está frequentemente exposto a diversos estresses ambientais tais como seca, salinidade e temperaturas extremas, o que pode influenciar o crescimento e em consequência a produtividade vegetal em áreas cultivadas. Dentre os recursos que a planta necessita para o seu desenvolvimento, a água é o mais abundante e contraditoriamente o mais limitante para produtividade agrícola. Com isso, a identificação de genes envolvidos na resposta a tolerância aos estresses abióticos torna-se de grande interesse para o estabelecimento de estratégias de melhoramento de plantas para obtenção de cultivares adaptadas aos diferentes tipos de estresse bem como para melhor compreensão dos mecanismos de respostas à tolerância ao estresse hídrico. Neste intuito, o estudo da expressão gênica tem demonstrado ser uma importante ferramenta para o entendimento dos processos biológicos envolvidos na tolerância a seca e na caracterização e identificação de genes associados a esses processos.

Bancos de genes transcritos têm sido de grande valia no estudo da expressão gênica, e o uso de tecnologias de sequenciamento de segunda geração, como a tecnologia de sequenciamento massal 454 GS-FLX, tem colaborado com o grande aumento de informações depositadas nos bancos de dados públicos, devido ao método rápido e eficiente para a análise de regiões transcritas do genoma e identificação de sequências diferencialmente expressas, genes-candidatos, entre amostras de tratamentos contrastantes.

A expressão diferencial de genes-candidatos precisa ser validada por meio de uma análise mais detalhada de seu perfil de expressão que pode ser obtida pela técnica de RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa) que se utiliza do método de quantificação por meio de medidas da fluorescência associada à síntese de fragmentos amplificados ao longo dos ciclos da PCR.

Este trabalho teve como objetivo identificar genes associados à resposta de tolerância à seca, por meio da validação de genes-candidatos selecionados a partir dos dados gerados por meio da análise massal do transcrito da espécie silvestre de *Arachis* (*A. duranensis*).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O amendoim (*Arachis hypogaea*)

O amendoim é a quarta oleaginosa mais produzida no mundo (Fig. 1), principalmente em regiões tropicais. No Brasil, a exploração comercial do amendoim concentra-se principalmente no Estado de São Paulo, com mais de 80% da produção nacional (Fig. 2). Segundo a Conab (2013), em São Paulo a cultura do amendoim é utilizada na renovação da cana-de-açúcar, que por ser uma leguminosa, incorpora nitrogênio ao solo favorecendo a replantação da cana-de-açúcar. A estimativa de área plantada para safra 2012/2013 é de 96,1 mil hectares, dentre estes, 79,3 mil hectares somente no estado de São Paulo, com uma produtividade média de 3.543kg/ha, superando a nacional de 3.280kg/ha. Espera-se que a produção nacional de amendoim para a safra de 2012/2013 seja de 315,2 mil toneladas, cerca de 6,5% a mais que o colhido na safra anterior.

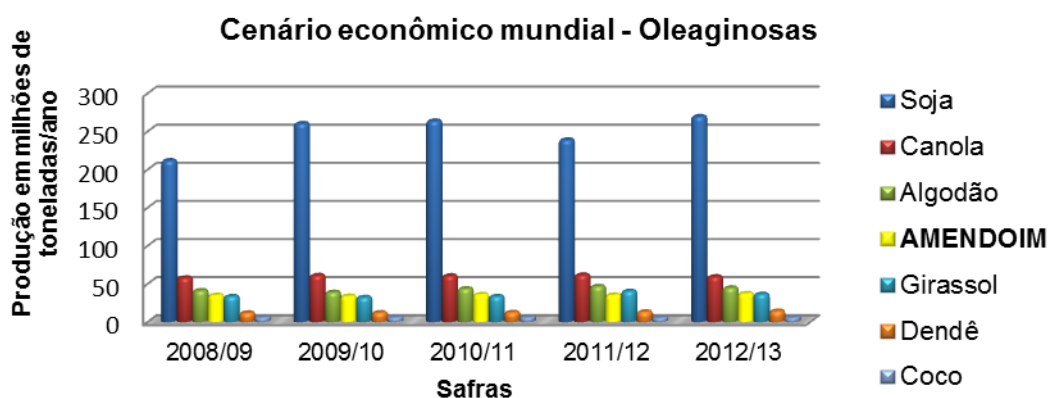


Figura 1 - Produção (em milhões de toneladas/ano) das principais oleaginosas produzidas no mundo, nas safras de 2008 a 2012 (USDA-FAS, 2013).

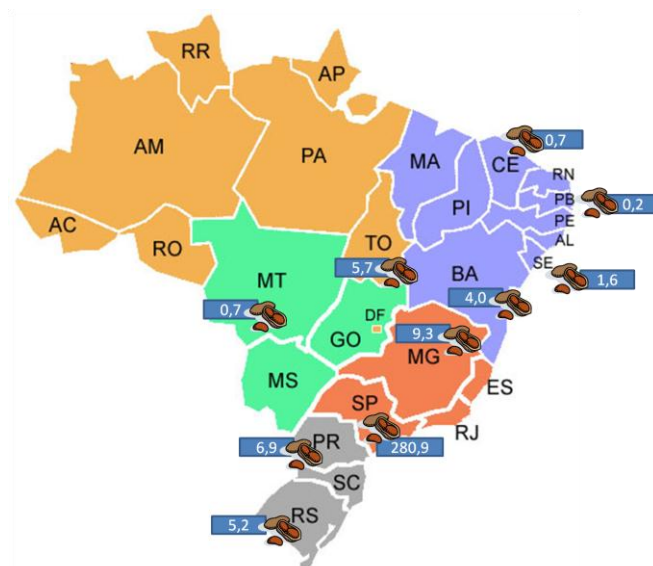


Figura 2 - Produção de amendoim no Brasil (em milhões de toneladas). Imagem adaptada aos dados contidos no relatório de Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos - Safra 2012/2013 (Martins, 2011; Conab, 2013).

O amendoim possui uma alta quantidade de óleo e proteínas, 40%-50% e 22-30% respectivamente, justificando assim, a sua excelente palatabilidade. A produção comercial de amendoim é destinada principalmente a iguarias como doces e confeitos. Há também o interesse na produção de óleo, uma vez que é uma semente com alto teor oleico, podendo ser também, uma cultura alternativa para biocombustíveis.

No aspecto citogenético, *A. hypogaea* se distingue por ser um alotetraplóide ($2n=40$), enquanto que a maioria das espécies selvagens é diploide ($2n=20$) e possui características de grande utilidade para serem incorporadas na espécie cultivada, como resistência a doenças, tolerância ao estresse hídrico e qualidade nutricional da semente. A obtenção, contudo, de híbridos férteis não é uma tarefa fácil de ser conseguida (Santos et al, 2005). Segundo Stalker e Simpson (1995) tal dificuldade reside no fato de existirem barreiras relacionadas com o evento anterior ou posterior à fertilização.

2.2. O gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* pertence à família das leguminosas, Fabaceae, e à subfamília Papilionideae (Bertioli et al., 2011). Engloba cerca de 80 espécies, cuja distribuição natural é restrita ao Brasil, Bolívia, Argentina e Uruguai (Valls e Simpson, 1994).

A origem do amendoim (*A. hypogaea* L.) está associada a um eventual cruzamento entre duas espécies silvestres diploides, que teria resultado em um híbrido estéril, cujos

cromossomos foram duplicados, levando a restauração da fertilidade (Fig. 3) e provável seleção de controle genético da meiose (Simpson et. al., 2001).

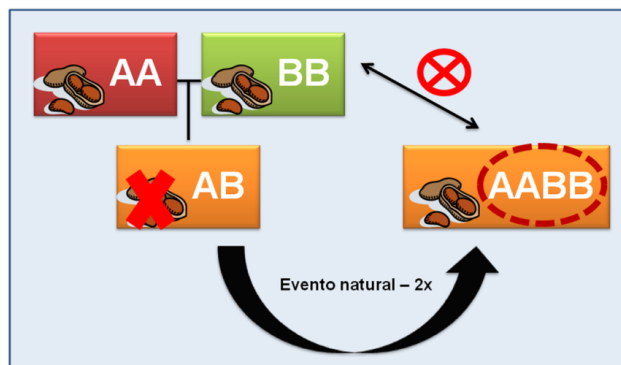


Figura 3 - Esquema ilustrativo do cruzamento eventual de duas espécies diploides (genoma AA e genoma BB) de *Arachis*, gerando um híbrido estéril (AB) (Martins, 2011).

O interesse pelos recursos genéticos de *Arachis* fundamenta-se no impacto econômico e ecológico potencial da exploração da variabilidade genética existente entre as diferentes cultivares de *A. hypogaea*, e ainda, na possibilidade de transferência de características genéticas desejáveis das espécies silvestres às cultivadas aproveitando sua eventual compatibilidade reprodutiva, mesmo que haja necessidade de níveis de ploidia (Valls, 2005).

2.3. O uso de espécies silvestres no melhoramento genético

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui o maior banco de germoplasma de *Arachis* silvestre do mundo, o qual pode ser explorado visando o melhoramento genético do amendoim (Simpson et al., 2001).

A partir da metade do século XX, o valor das espécies silvestres geneticamente mais próximas do amendoim, com maior potencial de uso em seu melhoramento, passou a ser reconhecido e pesquisado (Nogueira e Távora, 2005).

Os programas de melhoramento de amendoim se baseiam na introdução ou geração de variabilidade e posterior seleção de linhagens para caracteres de importância econômica ou cultural. Entre as características mais importantes, citam-se precocidade, produção de vagens, tolerância a fatores bióticos e abióticos e qualidade de grãos.

No Brasil, grande parte do melhoramento do amendoim é conduzida pelas vias tradicionais, dando-se ênfase aos caracteres quantitativos, mais especificamente àqueles relacionados aos componentes de produção da cultura e a alguns aspectos fitossanitários. A biotecnologia, em especial as tecnologias para análise genética e transferência de genes, pode

auxiliar de maneira mais significativa o melhoramento tradicional da cultura, através das ferramentas atualmente disponíveis da biologia molecular (Leal-Bertioli et al., 2005).

2.4. *Arachis duranensis*

Arachis duranensis, descoberta por Krapov. e W. C. Gregory (1994) é uma espécie silvestre diploide do gênero *Arachis* (seção *Arachis*) e provável progenitor do amendoim, sendo, portanto um excelente candidato doador do genoma AA para introgressão de genes (Kochert et al., 1991; Stalker et al., 1995).

Esta espécie é nativa da América do Sul e é encontrado principalmente em uma estreita faixa na parte ocidental da região do Chaco que se estende desde Villamontes no sul da Bolívia até El Tunal (perto de Joaguain Gonzalez) no norte da Argentina (Província de Salta) (Singh et al., 1996). Leal-Bertioli e colaboradores (2007) testaram cinco acessos de *A. duranensis* do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a fim de observar o comportamento de transpiração mediante a diminuição gradual dos níveis de água do solo. O acesso K7988 foi o único dentre os acessos de *A. duranensis* submetidos ao déficit hídrico que diminuiu a transpiração mais rapidamente.

2.5. Déficit hídrico

O déficit hídrico é um dos tipos de estresse abiótico mais crítico e comum que acometem as lavouras conduzidas em ambientes semi áridos. Seus efeitos são evidentes em qualquer estágio fenológico da planta, podendo variar de acordo com a severidade e duração do estresse (Farooq et al., 2009).

A habilidade de tolerar o estresse hídrico é uma característica que difere largamente entre as espécies cultivadas. Nas plantas mais sensíveis os processos fisiológicos são adversamente afetados devido à redução na hidratação dos tecidos. Nas tolerantes suas propriedades morfológicas e metabólicas as capacitam para manter alto grau de hidratação dos tecidos, mesmo sob limitado suprimento hídrico, possibilitando que a planta sobreviva a longos períodos de baixa hidratação tissular (Santos et al., 2000).

Em resposta à falta de água, as plantas engatilham vários eventos fisiológicos sendo mais comum o ajustamento osmótico onde elas se ajustam para manter o potencial hídrico e a turgescência das células próximas ao nível adequado. Tais processos são conseguidos por meio do acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular no citosol, destacando-se açúcares solúveis, prolina e aminoácidos livres (Nepomuceno et al., 2001). Independentemente do tipo de metabolismo, a falta de água leva à redução na atividade fotossintética e aumento na

respiração das plantas (Hansson, 2007). Com isso, torna-se importante à compreensão dos mecanismos de resposta das plantas sob condições limitantes de água para que futuramente tais características de tolerância ao estresse sejam transferidas para as culturas de interesse, além da identificação de genótipos que possam responder estavelmente no aspecto de produção, mesmo quando submetidos a situações de baixa e irregular disponibilidade hídrica (Pereira *et al.*, 2012).

Mesmo o amendoim sendo considerada uma das mais versáteis oleaginosas em termo de adaptação, ainda faz-se necessária a introgressão de determinados genes para que se obtenha a melhor expressão produtiva da planta, levando-se em conta a interação genótipo-ambiente, com o objetivo de otimizar o rendimento da cultura no ambiente a ser explorado (Knauff e Wyne, 1995). A obtenção de cultivares adaptadas aos estresses abióticos é assim um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do amendoim.

2.6. Análise de expressão gênica

Apesar de serem conhecidos os efeitos básicos gerais da seca no crescimento das plantas, em termos bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005).

Progressos no campo da genômica funcional têm permitido o estudo de respostas de plantas em todos os níveis do transcrito, isto é, um conjunto de transcritos em uma célula para um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica, revelando a natureza complexa das respostas multigênicas em plantas (Payton *et al.*, 2009; Martins, 2011), demonstrando ser uma importante ferramenta no entendimento dos processos biológicos, em nível molecular, podendo contribuir para caracterização da resistência ou tolerância de plantas.

Metodologias utilizadas para estabelecer perfis transcricionais baseando-se no sequenciamento aleatório de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) construídas a partir de mRNA (RNA mensageiro), isolado em um estágio de desenvolvimento e/ou tecido em particular (Luo *et al.*, 2005a; Luo *et al.*, 2005b; Malone *et al.*, 2006), facilitando a identificação de genes expressos ou genes transcritos (Guo *et al.*, 2008), favorecendo a descoberta de novos genes. Um notável número de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) e TSAs (*Transcriptome Shotgun Assembly*) está depositado no banco de dados do *GenBank*.

O uso de sequenciadores de nova geração, como a tecnologia de sequenciamento 454 GS-FLX, têm facilitado pela rapidez e eficiência a análise de regiões transcritas do genoma, pois remove várias etapas, como a clonagem, envolvidas no sequenciamento de transcritos pelo método Sanger (Margulies *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

2.7. Pirosequenciamento

Desenvolvida pela 454Life Sciences Corporation/Roche Applied Science, foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada. Trata-se de uma PCR em emulsão, onde a leitura das sequências é realizada pela combinação de reações enzimáticas iniciada pela adição de dNTP, com liberação de pirofosfato inorgânico (PPi) que é convertido em ATP pela ATP sulfúrilase. O ATP é oxidado pela enzima luciferase gerando a luciferina a qual produzirá um sinal luminoso que será capturado por uma câmara acoplada ao sistema 454 (Rothberg e Leamon, 2008; Carvalho e Silva, 2010).

Essa tecnologia utiliza volumes em picolitros de DNA. A plataforma GS-FLX Titanium tem capacidade de produzir em média um milhão de leituras, com tamanho médio de 300-450 pb (tecnologias mais recentes podem gerar fragmento de 500 a 1.000 pb) em 10 horas (Gilles *et al.*, 2011; Natarajan e Parani, 2011), e tem sido utilizado no sequenciamento de espécies cujo o genoma é pouco estudado, como o do amendoim.

2.8. PCR quantitativo (qPCR)

Estudos de análise de expressão gênica requerem uma etapa adicional para validação dos resultados, podendo ser realizada por meio de *Northern blotting*, ou mais recentemente, pelo método de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR). O desenvolvimento de RT-qPCR facilitou a detecção de transcritos por ser mais sensível, preciso, de boa reprodutibilidade, necessitando de uma quantidade menor de RNA e por apresentar resultados mais rápidos, pois funciona da mesma maneira que uma PCR convencional, porém com métodos de quantificação por meio de medidas, em tempo real, da fluorescência associada à síntese de amplicons ao longo dos ciclos da PCR. A fluorescência utilizada é o SYBR[®] Green I, que se incorpora a qualquer DNA de fita dupla emitindo uma luz verde captada pelo equipamento de RT-qPCR. O aumento do sinal fluorescente é captado até atingir um limiar, e o ponto que detecta o ciclo que a reação atingiu o limiar é chamado de C_T (Cycle threshold) ou C_q (Ciclo de quantificação). O valor de C_q é utilizado para quantificar montantes iniciais de DNA/cDNA ou para estabelecer uma curva padrão para estudos de expressão gênica ou análises comparativas (Martins, 2011).

Na RT-qPCR é necessária à utilização de um ou mais genes de referência que permita controlar parâmetros experimentais e avaliar a estabilidade de expressão dos genes-candidatos sob condições adversas (Gutierrez *et al.*, 2008). De acordo com Morgante e colaboradores (2011), *actina* (ACT1), *proteína ribossomal 60S* (60S) e duas *ubiquitinas* (UBI1 e UBI2) foram os mais adequados como genes de referência universal inter-espécies de *Arachis*.

3. Objetivos

3.1. Geral

Identificar e analisar o perfil de expressão de genes-candidatos associados à tolerância ao déficit hídrico, por meio da técnica de qPCR, em espécie silvestre de *Arachis* (*A. duranensis*).

3.2. Específicos

- a) Realizar ensaios do tipo *Dry Down* (diminuição gradual dos níveis de água no solo das plantas submetidas ao estresse hídrico) com *Arachis duranensis*;
- b) Extrair RNA total de raízes e folhas de *Arachis duranensis* submetidas e não submetidas ao déficit hídrico e sintetizar DNA complementar (cDNA);
- c) Identificar, a partir dos resultados do pirossenciamento, genes diferencialmente expressos associados à resposta a tolerância ao estresse hídrico durante a submissão e a não submissão das plantas a diminuição de água no solo;
- d) Analisar o perfil de expressão dos genes-candidatos selecionados por meio da tecnologia de transcrição reversa do RNA por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4. Material e Métodos

4.1. Ensaio *drydown*

Os experimentos foram realizados entre 2008 a 2013, em casas de vegetação e no Laboratório Interação Molecular Planta-Praga III, no prédio de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Sementes de *Arachis duranensis* (acesso K7988), foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF e germinadas em copos plásticos de 500cc, perfurados na parte inferior, contendo uma mistura de solo estéril, sulfato de amônia, calcário e Mastermins e mantidas em casa de vegetação. Sessenta dias após a germinação, as plantas foram divididas em dois grupos (controle e estressado), com o cuidado para que cada grupo incluísse plantas com o mesmo estágio fisiológico. A metodologia utilizada foi a descrita por Sinclair e Ludlow (1986) onde todos os copos plásticos foram saturados com água e mantidos em repouso por duas a três horas para que o excesso de água fosse escoado. No intuito de minimizar a evaporação do solo ser durante o ensaio, todos os copos dos dois grupos de plantas (controle e estressado) foram vedados com sacos plásticos até a base da parte aérea da planta, permitindo que a transpiração foliar fosse realizada normalmente (Fig. 4). Logo em seguida os copos foram pesados para determinar o peso inicial de cada planta. As plantas foram pesadas diariamente no final da tarde e seus pesos foram registrados. A taxa de transpiração foi calculada como a diferença do peso dos copos entre os sucessivos dias do ensaio. As plantas do grupo controle foram reidratadas diariamente com a quantidade de água correspondente à diferença de peso em relação ao dia anterior, que corresponde à água perdida por transpiração das plantas. Enquanto que o regime de reposição hídrica das plantas estressadas foi realizado, somente quando necessário, para manter a diminuição líquida diária do solo em menos de 70g, sendo calculada de acordo com a média de transpiração das plantas controle.

A taxa de transpiração normalizada (NTR – *Normalized Transpiration Ratio*), que é a quantificação da resposta da planta, foi calculada pela razão entre a média da transpiração das plantas estressadas e a média da transpiração das plantas controle.

Os pontos de coletas foram determinados pela alteração no padrão de transpiração das plantas submetidas à desidratação gradual em relação às plantas controle. Amostras de folhas e raízes foram coletadas em sete pontos distintos, sendo cinco determinados pela variação das NTR's e os outros coletados após 30 minutos e 72 horas após a reidratação (Fig.5 e Tab. 1). O material coletado foi envolvido em papel alumínio, devidamente identificados e submersos em

nitrogênio líquido para posterior armazenamento em refrigerador a -80°C e isolamento do RNA total.



Figura 4 - Plantas usadas no experimento de estresse hídrico. Visão geral das plantas em copos plásticos fechados com saco plástico para evitar perda de água por evaporação.

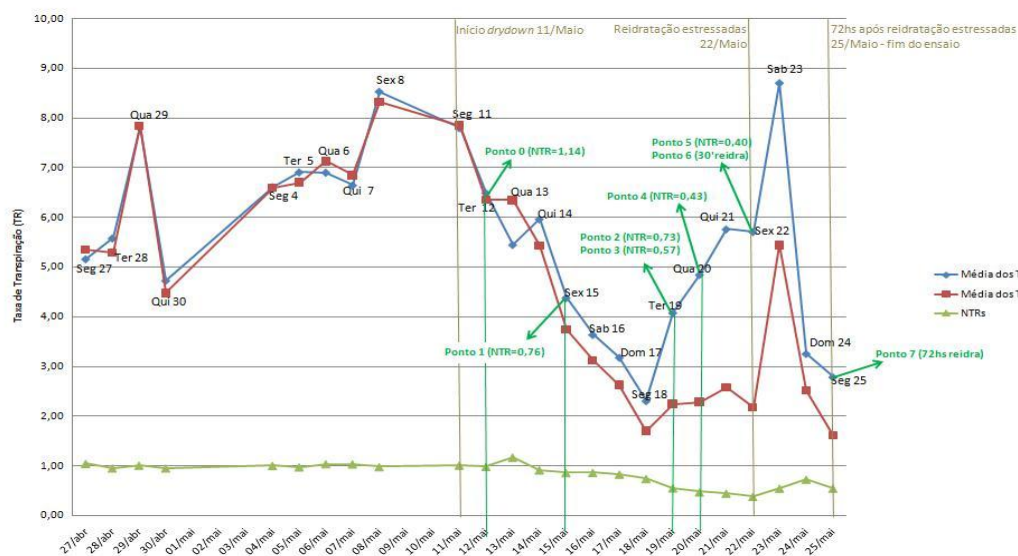


Figura 5 - Evolução das taxas de transpiração (TRs – *TranspirationRatio*) e das taxas de transpiração normalizadas (NTRs – *NormalizedTranspirationRatio* – linha verde) ao longo do experimento nos grupos de plantas controle (linha azul) e estressado (linha vermelha).

Tabela 1 - Pontos de coleta do experimento. CTR - Controle; EST - Estressado; NTR - Taxa de transpiração normalizada.(*) Ponto de coleta após 30 minutos de reidratação; () Ponto de coleta após 72 horas de reidratação.**

Ponto de coleta	Nº de plantas	NTR
Ponto 0 (12/Mai)	4 CTR	1,14
Ponto 1 (15/Mai)	4 CTR/ 4 EST	0,76
Ponto 2 (19/Mai)	4 CTR/ 4 EST	0,73
Ponto 3 (19/Mai)	4 CTR/ 4 EST	0,57
Ponto 4 (20/Mai)	4 CTR/ 4 EST	0,43
Ponto 5 (22/Mai)	5 CTR/ 5 EST	0,40
Ponto 6 (22/Mai)*	5 CTR/ 5 EST	0,59
Ponto 7 (25/Mai)**	4 CTR/ 4 EST	1,15

4.2. Extração e análise qualitativa e quantitativa do RNA total

A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo modificado de LiCl (Cloreto de Lítio) por Morgante e colaboradores (2011), utilizando as seguintes soluções: tampão NTES (NaCl 0,1M, Tris-HCl 0,01M, EDTA 1mM, SDS 1% e quantidade suficiente de H₂O DEPC 0,1% para 100 mL de tampão), Clorofane (25:24:1 – Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico), Acetato de Sódio - AcNa- 3M pH 4,5, LiCl - 4M, H₂O DEPC 0,1%, Etanol absoluto (100%) e Etanol 70% gelados. A exceção de SDS, clorofane e etanol, todas as demais soluções foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

O material coletado foi macerado em almofariz, previamente refrigerado com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, mantendo-o congelado durante todo o processo de maceração. Aproximadamente 750 mg do material macerado foi transferido para tubo falcon de 15 mL refrigerado e mantido em nitrogênio líquido até a etapa inicial de extração.

A cada tubo adicionou-se o tampão NTES e clorofane, em quantidades equivalentes ao volume inicial de material vegetal aos tubos, agitando-os a temperatura ambiente a fim de obter uma homogeneização da amostra, sendo logo em seguida centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C. Transferiu-se a fase superior aquosa para novo um novo tubo falcon de 15 mL. Centrifugou-se, novamente, a 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C, para a retirada de qualquer resíduo de contaminantes. Transferiu-se, cuidadosamente, a fase aquosa para um novo tubo falcon de 15 mL. A partir desta etapa todas as amostras foram constantemente mantidas em gelo. Ao volume obtida fase aquosa, adicionou-se 1/10 de acetado de sódio e 2,5 vezes de

etanol absoluto gelado. As amostras foram incubadas a -20°C por duas horas. Após este período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos à 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi dissolvido em 1 mL de H_2O DEPC 0,1% e transferido para um microtubo de polietileno de 1,5 mL. Centrifugou-se as amostras a 5.000 rpm por três minutos à 4°C . Transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo de 2,0 mL e adicionou-se o mesmo volume de LiCl. As amostras foram incubadas durante toda a noite (*overnight*) a 4°C . No segundo dia de extração as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos à 4°C . Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 500 μL de H_2O DEPC. Adicionou-se 1/10 de acetato de sódio e 2,5 vezes de etanol absoluto gelado ao resultante do que foi ressuscitado. Os tubos foram agitados manualmente e incubados a -20°C por duas horas. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos à 4°C . Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet com 500 μL de etanol 70% gelado. Por fim, centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 5 minutos à 4°C , descartando o sobrenadante. Secou-se o *pellet* à temperatura ambiente e o RNA obtido foi ressuscitado em 50 μL de H_2O DEPC 0,1%.

Para a avaliação qualitativa da integridade do RNA total extraído, utilizou-se a análise em de eletroforese em gel 1,5%, corado com brometo de etídio. A avaliação quantitativa foi realizada por meio de espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 da ThermoScientific) sob a observação dos valores da relação 260/280 nm acima de 1,8.

Parte do material extraído de todos os pontos coletados foi agrupado de acordo com os grupos determinados no ensaio (controle e estressado). Essas amostras foram enviadas à empresa CD Genomics, onde construiu-se duas bibliotecas de cDNA (do grupo controle e do grupo estressado) e se realizou-se o sequenciamento 454.

O RNA total restante foi utilizado para formação de amostras agrupadas por meio da junção equitativa de RNA total de diferentes plantas extraídas individualmente, do mesmo ponto de coleta, mesmo tecido (folha e raiz) e mesmo grupo. Todo esse material foi purificado em colunas do Kit Invisorb[®] Spin Plant Mini (Invitex). Para tanto, adicionou-se ao RNA total 900 μL da solução de lise DCT. Agitou-se os tubos manualmente. Centrifugou-se as amostras em velocidade máxima (13.200 rpm) por 1 minuto a temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para o pré-filtro contido em um tubo receptor de 2,0 mL. Centrifugou-se por 10.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o pré-filtro. Ao filtrado obtido, adicionou-se 500 μL de etanol absoluto gelado. Transferiu-se 750 μL do filtrado para o filtro RTA spin e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado. Essa última etapa foi repetida mais uma vez. Adicionou-se 500 μL do tampão de lavagem R1. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartou-se o filtrado. Adicionou-se 700 μL do tampão de lavagem R2. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartou-se o filtrado. Repetiu-se a lavagem com o tampão R2. Descartou-se o filtrado. Sem adicionar nada centrifugou-se a 12.000 rpm por 3 minutos. Transferiu-se o filtro RTA spin para o tubo de eluição livre de RNase. Adicionou-se de 30 a 60 μL do tampão de eluição R. Incubou-

se as amostras por 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto. As amostras foram imediatamente incubadas no gelo.

A qualidade e quantidade das amostras de RNA foram novamente avaliadas conforme descrito anteriormente.

4.3. Síntese de cDNA

O RNA purificado foi utilizado como molde na síntese de cDNA utilizado na validação da expressão gênica por RT-qPCR. Para isso, 2µg de RNA total de cada ponto, tecido e grupo foi tratado com 2U de TURBO™ DNase (Ambion® - AppliedBiosystem™), em uma reação com 10 µL de volume final, que foi incubada a 37°C por 1 hora, seguida da desativação da enzima com 2,5mM de EDTA por 10 minutos a 65°C.

O RNA tratado com DNase foi utilizado para síntese de cDNA. Ao volume final de cada amostra tratada com DNase, adicionou-se uma mistura contendo 1 µL de AnchoredOligo (dT)₂₀ 50mM (Invitrogen™), 1 µL de dNTP 10 mM. Incubou-se as amostras a 65°C por 5 minutos e depois no gelo por mais 5 minutos. Adicionou-se para cada amostra uma mistura para transcrição reversa, contendo 4µL do tampão 5X FS (*First Strand Buffer*) da enzima, 2µL de DTT 0,1M e 1µL da enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen™). Incubou-se a 42°C por 60 minutos e por último, a 70°C por 15 minutos, para desativação da enzima.

Para conferir a ausência de contaminação por DNA genômico nas amostras de cDNA sintetizadas, realizou-se uma PCR convencional utilizando-se um par de primers leg066, Forward (5'AGCTCCACCTCTTTCCGACAGA3') e Reverse (5'AGTTTCTACAGCACGTATCCTTTCC3'), que flanqueiam uma região intrônica conservada em *Arachis* (Hougaard *et al.*, 2008; Morgante *et al.*, 2011) e permite a distinção entre os produtos de PCR amplificados a partir de um DNA genômico ou de um cDNA (Morgante *et al.*, 2011). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 13,5µL, contendo tampão 1x, MgCl₂ 1,44mM, dNTP 2,44mM, BSA 0,5mg/mL, 0,15µM de cada primer, 1,5U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen™) e 1µL de cDNA. Esta reação foi realizada no termociclador Master Cycler (Eppendorf), sendo submetida a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos repetitivos de amplificação: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e a um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídio.

4.4. Desenho dos primers para os genes-candidatos selecionados

A partir dos resultados obtidos pelo pirosequenciamento em massa em 454 e submetidos a uma análise da expressão diferencial e da anotação em BLASTx, ou seja análises de similaridade com sequências depositadas no banco da base de sequências do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), selecionou-se sete genes-candidatos. A escolha destes genes foi de acordo a função dos mesmos relacionados à resposta a tolerância ao déficit hídrico e sua relevância já citados na literatura.

Com o auxílio do programa *Primer3plus* desenhou-se os sete pares de *primers* a serem utilizados na avaliação do perfil de expressão por RT-qPCR. Os parâmetros utilizados neste programa para desenho dos *primers* foram: fragmento amplificado (*amplicon*) com tamanho entre 150-200pb, *primers* com tamanho entre 19-22pb, com temperatura de dissociação (T_m) entre 59-61°C e porcentagem de bases GC no *primer* entre 45-55%.

4.5. RT-qPCR

A reação de RT-qPCR (PCR quantitativa precedida de transcrição reversa utilizando o cDNA como molde) foi realizada no F7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando-se o reagente Platinum® SYBR® Green RT-qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen™) composto por uma mistura que contém, com exceção dos primers e da fita molde, todos os outros componentes necessários para amplificação e detecção do DNA por qPCR (PCR quantitativa). A reação foi preparada em um volume final de 10 µL, contendo 5µL do SuperMix SYBR Green, 0,2 µM de cada primer e 2 µL do cDNA diluído a 10^{-2} . A análise da expressão dos genes-candidatos (genes-alvo) selecionados foi realizada separadamente, isto é, por ponto e por grupo, para cada amostra de cDNA, em duplicatas técnicas e duplicatas biológicas, todas com fator de diluição 10^{-2} . Para essa análise, a quantificação da expressão gênica foi baseada na expressão de um gene-alvo em relação a um gene de referência, previamente selecionado (Morgante *et al.*, 2011). Os genes referência utilizados foram o *Actina* (C23) e *Ubiquitina* (C36).

Para a determinação da expressão relativa, os valores do ciclo limiar (C_T ou C_q), para cada amostra, foram obtidos a partir de dados brutos de fluorescência, com uso do programa Miner (Zhao e Russel, 2005).

Os níveis de expressão dos genes testados foram calculados e analisados estatisticamente por meio do software REST© (Pfaffl *et al.*, 2002).

5. Resultados

5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a análise da expressão gênica durante a indução do déficit hídrico é necessário que haja integridade e qualidade do RNA total extraído, bem como qualidade do cDNA sintetizado, o que pode ser observado em gel de agarose 1,5% (Figs. 6 e 7).

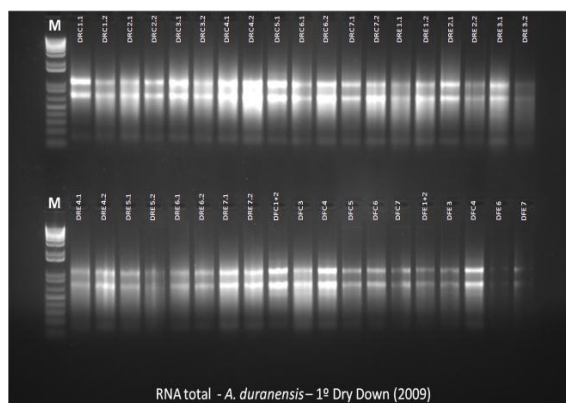


Figura 6 - Gel de agarose (1,5%) de RNA total extraído de raízes de *A. duranensis* submetidas ao estresse hídrico. (M) Marcador molecular DNA 1kb plus.

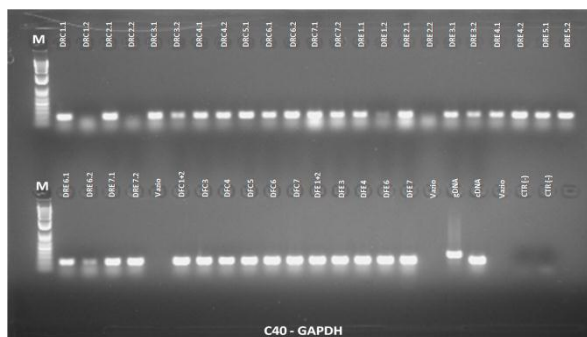


Figura 7 - Gel de agarose (1,5%) do cDNA sintetizado a partir de amostras de raízes de *A. duranensis*. (M) Marcador molecular DNA 1kb plus.

5.2. Análise da qualidade do cDNA

A qualidade do cDNA sintetizado de cada um dos diferentes pools de RNA total de raiz de *A. duranensis* (controle e estressado) foi avaliada pela técnica de RT-PCR.

5.3. Escolha dos genes-candidatos

Tabela 2 - Primers desenhados para os genes-candidatos selecionados em *A. duranensis*.

Nº	Gene	Nome do primer	Sequência 5'-3'	Tamanho primer (bp)	Solicitante	Escala de Síntese
1	Citocromo P450	4Ad185F	CAATGCGTGGAGCTCAAATAGTCT	24 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad185R	AGTGGTCCTCTGTTACTCCATG	23 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
2	Aquaporina PIP2	4Ad381F	AACACACAAGAAGGGTCCCA	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad381R	GCTCTGGATCCTTCAGGAGCA	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
3	Metiltransferase	4Ad40F	ACACCGGCTTCGCTTTCGAT	20 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad40R	TGGGAAGGCCTCAATGATGGA	21 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
4	Metalotroneína 2	4Ad317F	TCACACGCACAGCAGAAAGCA	20 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad317R	TGCAGCAAGACACAGGCCACTT	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
5	Dehidrina	4Ad290F	TTGTCGTCAAACCTCGGTGGCGA	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad290R	TCATGGCAGAGGAGCACCAAA	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
6	Chaperona	4Ad389F	AAGATGCAAAACATGCCGCCCT	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad389R	CCAAAGCAAGCACCGAAGCTAC	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
7	Esterase	4Ad457F	AGAGGAGGAGGTCGTTTTGGA	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol
		4Ad457R	ACTTGTGCAAAATAGCCAAGTGG	22 pb	Ana Brasileiro	10 nmol

5.4. Validação dos genes-candidatos por RT-qPCR

A análise de expressão gênica de sete genes-alvo foi feita por meio da técnica de RT-qPCR, sendo quatro genes *up* regulados, dois genes *down* regulados e um gene que não apresentou significância.

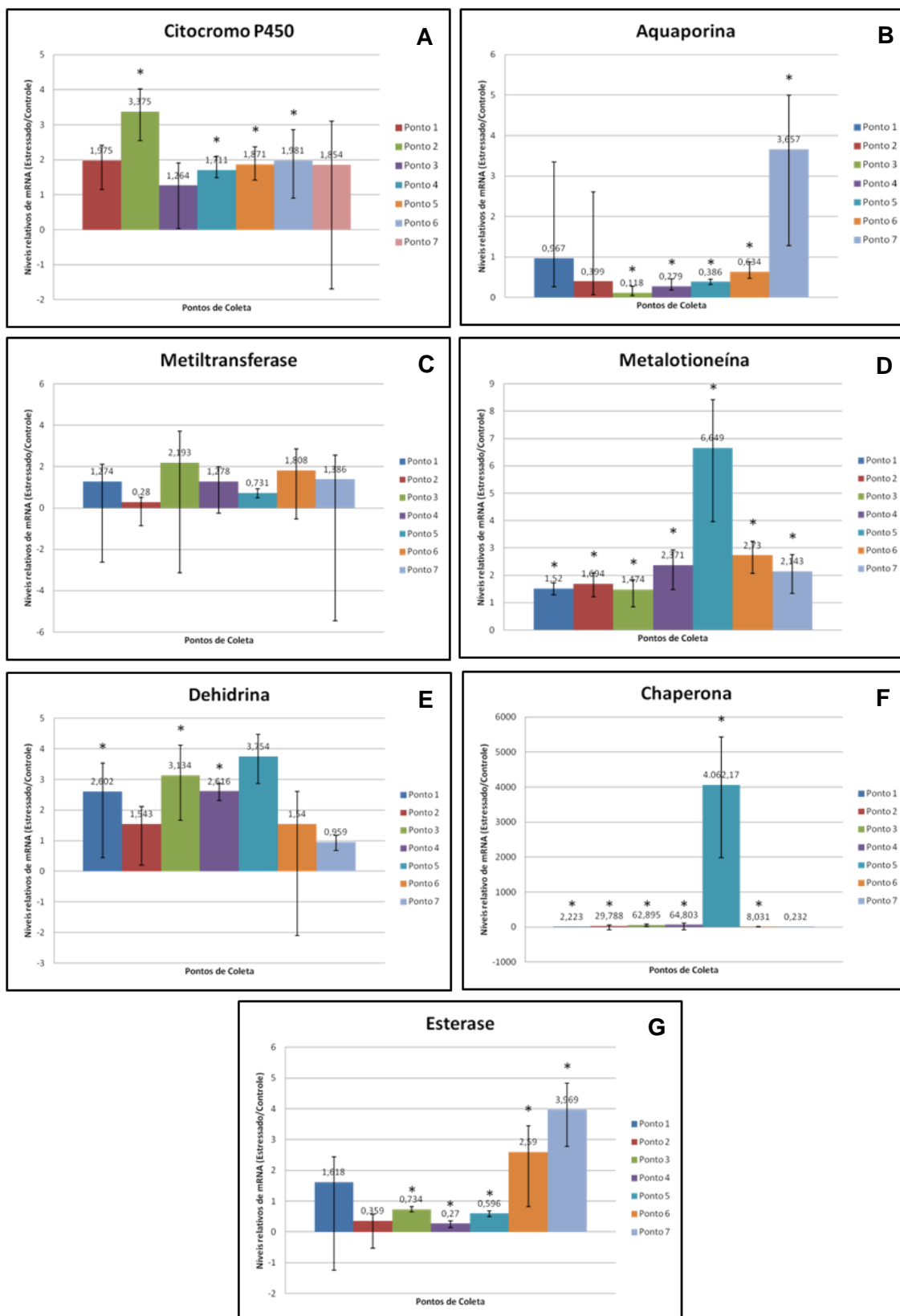


Figura 8 - Análise da quantificação relativa (RQ) por RT-qPCR para os 7 genes-candidatos, a partir da média obtida entre as replicatas biológicas de cada um dos pontos de coleta de raiz de *A. duranensis*. Os níveis relativos de mRNA (razão entre EST/CTR) estão representados por barras e o desvio-padrão das triplicatas pelas linhas verticais. Dados normalizados com o genese referência *Actina* e *Ubiquitina*. (A) RQ de Citocromo P450; (B) RQ de Aquaporina; (C) RQ de Metiltransferase; (D) RQ de Metalotioneína; (E) RQ de Dehidrina; (F) RQ de Chaperona; (G) RQ de Esterase. (*) Ponto que foram significativamente regulados (positiva ou negativamente).

6. Discussão

O sistema do Citocromo P450 consiste numa superfamília de monooxigenases presente nos procariontes, plantas e animais. É um grupo de proteínas redox que cataliza várias reações oxidativas (Isin e Guengerich, 2007) de compostos endógenos e exógenos, concluindo assim que, esta proteína atua na síntese e metabolismo de muitos compostos importantes, que atuam como agentes de defesa vegetal (Kim e Tsukaya, 2002). De acordo com a figura 8A, vê-se um gene positivamente regulado mediante déficit hídrico.

As aquaporinas são proteínas específicas da membrana plasmática das plantas, que atuam no transporte de água. Sabe-se que em condições de déficit hídrico, as plantas ativam sistemas de proteção, onde há uma redução de transpiração e na abertura estomática, com a finalidade de diminuir a perda de água. Neste estudo, tal informação foi confirmada, uma vez que, esta proteína, teve sua expressão reprimida, em condições de máximo estresse hídrico, e nos pontos de reidratação, a mesma, voltou a se comportar normalmente. Mahdieh e colaboradores(2008), obteve um resultado similar, em relação ao padrão de expressão gênica da aquaporina sob estresse hídrico, em plantas de *Nicotiana tabacum*. Segundo Aroca e colaboradores (2011), as aquaporinas PIP2, atuam na regulação de absorção de água pelas raízes, encontradas então, em maior quantidade nos sistemas radiculares. As aquaporinas representam um papel importante na condutividade hidráulica em raízes e folhas, através das membranas celulares e por consequência no crescimento e desenvolvimento da planta .De acordo com a figura 8B, vê-se uma menor significância da expressão gênica da aquaporina, nos primeiros pontos de estresse, sugerindo assim que nos períodos iniciais de desidratação, há uma redução da permeabilidade da membrana, promovendo assim, uma maior conservação de água e preservando o turgor celular (Li *et al.*, 2000). Uma diminuição inicial na expressão do estresse moderado pode ajudar a reduzir o transporte de água e conseqüentemente diminuir a abertura estomática para manter o nível de água na planta (Li *et al.*, 2000). A repressão da expressão gênica em aquaporinas é comumente relacionada a perdas na condutividade hidráulica dos órgãos das plantas, principalmente nas raízes (Herizleret al., 1999). Plantas submetidas ao estresse hídrico modulam o perfil de expressão gênica das aquaporinas para permitir a homeostase de água sob condições de estresse.

Como a degradação de proteínas é geralmente alta durante a desidratação celular, é de se esperar que sistemas de reparo sejam normalmente expressos durante situações de estresse. Um exemplo que ilustra essa situação é a observação de que a produção da enzima metiltransferase é induzida durante a desidratação celular. Essa enzima atua no reestabelecimento da atividade de uma proteína que estava danificada, devido o estresse (Mudgett e Clarke, 1994). A metiltransferase é uma proteína com funções pouco conhecidas, principalmente quando relacionada à déficit hídrico. Tem seu perfil de expressão constante

durante o estresse (Figura 8C) inferindo então, que são proteínas já presentes no metabolismo da planta e que mediante situações adversas, tem pouca variação na expressão gênica.

A metalotioneína, é uma proteína queladora de metais que quando exposta a déficit hídrico severo, tem sua expressão aumentada (Rodrigues, 2008). É reconhecida como parte de uma resposta ao estresse, principalmente oxidativo, apesar de poder estar indiretamente relacionada com a presença de metais (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Neste trabalho, observou-se que durante o estresse as plantas ativam mecanismos de defesa, onde o acúmulo de solutos é uma maneira de ajustar o potencial osmótico. Com isso, em condições de seca extrema (Figura 8D) tem-se um maior acúmulo de solutos e portanto, uma maior atividade da metalotioneína.

De acordo com Nylandere colaboradores (2001), as desidrinas são expressas em condições de estresse hídrico, sendo outra proteína, que protege as células contra estresses oxidativos, e também apresenta um aumento de sua expressão de acordo com a severidade de estresse hídrico que a planta foi exposta, e posteriormente uma diminuição no seu padrão de expressão, quando retoma-se a irrigação (Figura 8E).

As chaperonas, proteínas de choque térmico, são um grupo de produtos de genes usualmente encontrados em plantas submetidas ao estresse hídrico. Têm a função de ajudar no correto dobramento ou na prevenção da desnaturação das proteínas (Zhu *et al.*, 1993). São proteínas que durante situações de estresse, com aumento significativo na sua produção, uma vez que, como o estresse promove a desnaturação e a agregação de outras proteínas. Uma maior síntese de chaperonas ajudaria a proteger essas outras proteínas durante o estresse osmótico que ocorre após a desidratação da célula (Zhu *et al.*, 1997). Na figura 8F, observa-se este tipo de comportamento, uma vez que no ponto 5, ponto de máximo estresse hídrico, esta proteína teve uma superexpressão quando comparada aos demais pontos, principalmente aos pontos 6 e 7, que são pontos respectivos à reidratação.

A esterase é uma enzima envolvida na hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo dos lipídeos. Sendo a peroxidação de lipídeos um evento associado a danos de membrana das sementes, alterações nos padrões dessa enzima podem estar denotando a ocorrência de eventos deteriorativos, que podem estar contribuindo para a redução na germinação das sementes à medida que são aumentados os fatores temperatura e teor de água das sementes no processo de deterioração controlada (Padilha *et al.*, 2001).

7. Conclusão

Atualmente, pesquisas relacionadas à adaptação de plantas a ambientes adversos, tem sido de grande valia, uma vez que este fator é um dos principais na redução de produtividade agrícola. Desta maneira, tem-se o objetivo de descobrir genes e seus mecanismos relacionados à tolerância à seca e posteriormente, habilitar a transferência destes genes para espécies de interesse econômico. Apesar da complexidade de se identificar os mecanismos de defesa da planta a estresses hídricos, em níveis metabólicos e genéticos, já se tem diversas hipóteses sobre estes mecanismos, como também, espécies nitidamente tolerantes à seca.

Realizar ensaios visando mimetizar condições de estresse hídrico é a melhor forma de estudar este fenômeno, uma vez que este tipo de estresse tem sido um dos principais fatores de perdas na produção, assim como, quando se faz cálculos de produção de uma determinada cultura, tem-se a irrigação como o fator que mais eleva os custos de produção.

A análise do transcriptoma é importante quando deseja-se avaliar especificamente a expressão gênica, e para tanto, tem-se necessário um RNA de qualidade. Neste presente trabalho, avaliou-se a expressão gênica de *Arachis duranensis*, uma espécie descrita com a capacidade de manter seu metabolismo ativo mesmo em condições de deficiência hídrica. Os genes que foram avaliados, tem uma relação direta com o estresse hídrico sendo portanto, genes promissores a estudos mais profundos e posteriormente, sua caracterização mediante estresses.

Apesar de ser uma herança de caráter poligênica, ou seja, a tolerância à seca é advinda da ação de um conjunto de genes, tem-se a curiosidade de estudar genes promissores relacionados à adaptação a esse ambiente adverso, assim como relacionar sua expressão com a capacidade de resiliência que certas espécies têm quando expostas a situações críticas.

Dos sete genes candidatos, quatro foram positivamente regulados, dois negativamente regulados e um que não obteve expressão diferencial significativa. De acordo com estes resultados, os dados obtidos são coerentes com os descritos na literatura.

Até o presente momento, este é o primeiro relato sobre a análise massal de transcriptoma *Arachis* silvestre sob estresse hídrico. As informações produzidas neste estudo é um recurso valioso para a identificação de genes, caracterização de novos alelos silvestres, e desenvolvimento de marcadores moleculares.

Como perspectiva futura, tem-se a caracterização de alguns destes genes citados, para posteriormente, serem introduzidos em espécies de interesse econômico.

Por fim, este trabalho foi de grande valia, podendo ser utilizado para uma melhor caracterização e compreensão dos genes envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca.

8. Referências Bibliográficas

Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2011), Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 63(1): 43-57.

Bertioli, D.J., Seijo, G., Freitas, F.O., Valls, J.F., Leal-Bertioli, S.C., Moretzsohn, M.C. (2011). An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 9(1):134-149.

Brasileiro, A.C.M., Santos, C.R.M., Morgante, C.V., Martins, A.C.Q., Silva, F.R., Araújo, A.C.G., Bertioli, D.J., Leal-Bertioli, S.C.M., Guimarães, P.M. (2009). Análise in silico da expressão diferencial de plantas de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 229, p.10.

Carvalho, M.C., Silva, D.C. (2010). Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, 40(3):735-744.

Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159-182.

Conab. (2013). Conab - Acompanhamento da Safra Brasileira - Grãos - Safra 2012/2013 - 5º levantamento. Acesso em fevereiro de 2013, disponível em Conab: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_02_08_17_24_51_boletim_fevereiro_2013.pdf

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. (2009). Plant drought Stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable and Development*, 29(01): 185-212.

Gilles, A., Megléczy, E., Pech, N., Ferreira, S., Malausa, T., Martin, JF. (2011). Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12: 245.

Guo, B., Chen, X., Dang, P., Scully, B.T., Liang, X., Holbrook, C.C., Yu, J., Culbreath, A.K. (2008). Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. *BMC Developmental Biology*, 8:12.

Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., Wuytswinkel, O.V. (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, 20: 1734-1735.

Isin, E.M., Guengerich, F.P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1770(3): 314-329.

Kim, G., Tsukaya, H. (2002). Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s. *Journal of Plant Research*, 155(3): 169-177.

- Krapovickas, A., Gregory, W.C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonpladia*8:1-186.
- Kochert, G., Halward, T., Branch, W.D., Simpson, C.E. (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied Genetics*,81(5):565-570.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Vadez, V., Guimarães, P.M., Silva, P.I.T., Moraes, L.F.M.V., Bertioli, D., Araújo, A.C. (2008). Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*166, p. 17.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Moretzsohn, M.C., Bertioli, D.J., Guimarães, P.M. (2005). Perspectivas da biotecnologia na busca de resistência em *Arachis* spp. In: Santos, R.C. (Ed.). *O Agronegócio do Amendoim no Brasil*. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 423-428.
- Li, Y., Luo, H.M., Sun, C., Song, J.Y., Sun, Y.Z., Wu, Q., Wang, N., Yao, H., Steinmetz, A., Chen, S.L. (2010). EST analysis reveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis. *BMC Genomics*, 11: 268.
- Luo, M., Dang, P., Guo, B.Z., He, G., Holbrook, C.C., Bausher, M.G., Lee, R.D. (2005a). Generation of Expressed Sequence Tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut. *Crop Science*,45:346-353.
- Luo, M., Dang, P., Bausher, M. G., Holbrook, C. C., Lee, R. D., Lynch, R. E., et al. (2005b). Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytopathology*,95(4):381-387.
- Luu, D.T., Maurel, C. (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell & Environment*, 28(1): 85–96.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T., Katsuhara, M. (2008). Drought Stress Alters Water Relations and Expression of PIP-Type Aquaporin Genes in *Nicotiana tabacum* Plants. *Plant & Cell Physiology*, 49(5): 801–813.
- Malone, G., Zimmer, P.D., Meneghelo, G.E., Binneck, E., Peske, S.T. (2006). Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. *Revista Brasileira de Agrociência*. Pelotas, 12(1):07-13.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057):376-380.
- Martins, A.C.Q. (2011). Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na resistência de amendoim silvestre (*Arachis stenosperma*) ao *Passalora personata*, o agente causal da mancha preta do amendoim. Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação em

Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, p. 132.

Morgante, C.V., Guimarães, P.M., Martins, A.C.Q., Araújo, A.C.G., Leal-Bertioli, S.M., Bertioli, D.J., Brasileiro, A.C.M. (2011). Reference Genes for Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Expression Studies in Wild and Cultivated Peanut. *BMC Plant Biology*, 4:339.

Mudgett, M.B., Clarke, S.(1994). Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41):25605-25612.

Natarajan, P., Parani, M. (2011). De novo assembly and transcriptome analysis of five major tissues of *Jatropha curcas* L. using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12:191.

Nepomuceno, A.L., Neumaier, N., Farias, J.R.B., Oya, T. (2001). Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 04(23): 12-18.

Nogueira, R.J.M.C., Távora, F.J.A.F. (2005). Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: Santos, R.C. (Ed.). *O Agronegócio do Amendoim no Brasil*. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 77-113.

Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B.V.(2001). Stress induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 45(3): 263-279.

Padilha, L., Vieira, M.G.G., Pinho, E.V.R.V., Carvalho, M.L.M (2001). Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. *Revista Brasileira de Sementes*, 23(1): 198-204.

Payton, P., Kottapalli, K.R., Rowland, D., Faircloth, W., Guo, B., Burow, M., Puppala, N., Gallo, M. (2009). Gene expression profiling in peanut using high density oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*, 10:265.

Pereira, J.W.L., Filho, P.A.M., Albuquerque, M.B., Nogueira, R.J.M.C., Santos, R.C. (2012). Biochemical changes in peanut genotypes submitted to moderate water stress. *Revista de Ciência Agronômica*, 43(4): 766-773.

Pfall, M.W., Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23: 275-282

- Rodrigues, F.A (2008). 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, Câmpus de Jaboticabal, p.39.
- Rothberg, J.M., Leamon, J.H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10):1117-1124.
- Santos,R.C., Godoy, J.I., Fávero, A.P.(2005). Melhoramento do Amendoim. In: Santos, R.C. (Ed.). *O Agronegócio do Amendoim no Brasil*. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 125-177.
- Simpson, C.E., Krapovickas, A., Valls, J.F. (2001). History of *Arachis* including evidence of *A. hypogaea* L. progenitors. *Peanut Science*,28(2):78-80.
- Sinclair, T. R., Ludlow, M. M. (1986). Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 329-341.
- Singh, A. K., Subrahmanyam, P., Gurtu, S. (1996). Variation in a wild groundnut species, *Arachis duranensis* Krapov. & W.C. Gregory. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43:135-142.
- Stalker, H.T., Dhesi, J.S., Kochert, G. (1995). Genetic diversity within the species *Arachis duranensis* Krapov. & W.C. Gregory, a possible progenitor of cultivated peanut. *Genome*, 38:1201–1212.
- Stalker,H.T., Simpson, C.E.(1995). Germoplasm resources in *Arachis* in American Peanut Research and Education Society, p.14-53.
- Torres, T.T., Metta, M., Ottenwalder, B., Schlotterer, C. (2008). Gene expression profiling by massively parallel sequencing. *Genome Research*, 18:172-177.
- USDA-FAS. (2012). *Table 01: Major Oilseeds: World Supply and Distribution (Commodity View)*. Acesso em Fevereiro de 2013, disponível em USDA - United States Department of Agriculture/FAS - Foreign Agricultural Service: [http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+01%3a+Major+Oilseeds%3a+World+Supply+and+Distribution+\(Commodity+View\)+++++&hidReportRetrievalID=531&hidReportRetrievalTemplateID=5](http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Table+01%3a+Major+Oilseeds%3a+World+Supply+and+Distribution+(Commodity+View)+++++&hidReportRetrievalID=531&hidReportRetrievalTemplateID=5)
- Valls, J.F.M.(2005). Recursos genéticos do gnero *Arachis* in O Agronegócio do Amendoim no Brasil, p. 47-60.
- Yamaguchi-shinozaki, K.,shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*,10:88-94.
- Zhao, S.,Russel,F. (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology*, 12: 1047–1064.

Valls, J.F.M., Simpson, C.E. (1994). Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis* in Biology and agronomy of forage *Arachis*. CIAT, cap.1, p.1-18.