

Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de plantas de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 229

**Análise *in silico* da expressão gênica
diferencial de plantas de *Arachis
magna* submetidas a estresse
hídrico**

**Brasileiro, A.C.M.
Santos, C.M.R.
Morgante, C.V.**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Lígia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Capa: Plantas de *A. magna* (acesso KG30097) com 150 dias após a germinação, no primeiro dia do ensaio de desidratação gradual e controlada (dry down). Os vasos estão cobertos com saco plástico, deixando somente a parte aérea descoberta, e dentro de uma câmara fechada de acrílico.

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 Análise *in silico* da expressão diferencial de genes em *Arachis magna* sob estresse hídrico/ A. C. M. Brasileiro... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
20 p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 229).

1. *Arachis* – Melhoramento genético. I. Brasileiro, A. C. M. II. Série.

633.368 – CDD 21

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 7 |
| Introdução | 8 |
| Material e Métodos | 9 |
| Resultados e Discussão | 13 |
| Referências | 19 |

Análise *in silico* da expressão gênica diferencial de plantas de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico

Brasileiro, A.C.M.¹
Santos, C.M.R.²
Morgante, C.V.³
Martins, A.C.Q.⁴
Silva, F.R.⁵
Araújo, A.C.G.⁶
Bertioli, D.J.⁷
Leal-Bertioli, S.C.M.⁸
Guimarães, P.M.⁹

Resumo

Os mecanismos de resposta ao estresse desencadeado por plantas submetidas a condições de seca afetam o seu crescimento, causando sérias limitações à sua produtividade. As respostas da planta ao estresse hídrico têm sido uma das ações de pesquisa de interesse estratégico em estudos celulares, fisiológicos e moleculares e tornaram-se uma importante temática do melhoramento genético de plantas. Devido à complexidade das respostas à seca, projetos voltados para a análise em larga escala de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) podem contribuir para a identificação de genes associados e para um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância à seca. As espécies silvestres do gênero *Arachis* são muito diversas geneticamente, apresentando adaptações aos mais variados ambientes e podem oferecer uma rica e inexplorada fonte de diversidade alélica relacionada aos estresses biótico e abiótico.

Como primeira etapa de identificação de genes envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico em *Arachis*, o perfil de transpiração de 18 acessos silvestres foi comparado ao de três cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea*). De maneira geral, as espécies silvestres apresentaram um decréscimo mais rápido na sua taxa de transpiração em relação às cultivares de amendoim. Em particular, *A. magna*, uma espécie diplóide com genoma do tipo BB, apresentou alta adaptação sob condições de estresse hídrico. No presente estudo, o transcrito de *A. magna* acesso KG30097 submetida a estresse hídrico gradual foi analisado. Para tanto, duas bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas a partir de folhas de plantas em condições de estresse hídrico e do respectivo controle irrigado regularmente. As bibliotecas foram construídas nas duas direções, i.e., o cDNA das plantas estressadas foi utilizado com *driver* e subsequentemente como *tester*, permitindo o enriquecimento de genes induzidos ou inibidos durante o estresse hídrico. A análise *in silico*

¹ Eng. Florestal., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Eng. Agrônoma, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, graduanda, Universidade Católica de Brasília – UCB

⁵ Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁷ Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília – UCB

⁸ Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁹ Eng. Agrônoma, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

revelou 759 leituras que foram agrupadas em 249 *clusters* (138 *singlets* e 111 *contigs*), com um índice de novidade de 32,8%. Vários genes regulados exclusivamente na condição de estresse hídrico ou irrigação regular foram identificados. Treze genes-candidatos, expressos diferencialmente e relacionados à resposta ao estresse abiótico, foram selecionados para posterior validação por RT-qPCR. Até o momento, este é o primeiro estudo de análise do transcrito de uma espécie silvestre de *Arachis* sob estresse hídrico. A informação obtida neste estudo é uma rica fonte para a identificação de genes, caracterização de novos alelos e desenvolvimento de marcadores moleculares.

Palavras-chave: *Arachis*; seca; SSH; EST.

Abstract

The stress-responsive mechanisms triggered in plants under drought affect plant growth and cause serious limitation to crop productivity. Therefore, plant responses to drought stress have become an important field in plant molecular research. Given the complexity of drought response, large-scale ESTs (*Expressed Sequence Tags*) projects have the potential to aid gene discovery and the understanding of drought tolerance mechanisms in plants. Due to its high genetic diversity and adaptation to a range of environments, wild relatives of peanut (*Arachis hypogaea*) constitute a rich source of allele diversity for resistance to biotic and abiotic stresses.

As a first step to identify drought-responsive genes in *Arachis*, transpiration profile of 18 wild species accessions was compared to three peanut cultivars. Wild species showed overall a faster decrease of transpiration rate than the cultivars tested. Particularly *A. magna*, a wild BB diploid species, showed high adaptability to water stress conditions. In this study, the transcriptome of *A. magna* accession KG30097 under gradual water stress was analyzed. For that, two subtractive libraries were constructed using cDNA from leaf tissues of water-stressed and well-watered control plants. Subtractive hybridization was performed in both directions, i.e., cDNA from stressed plants was used as driver and afterwards as tester, allowing the enrichment for genes either induced or inhibited during water stress. *In silico* analysis revealed 759 reads, which were grouped into 249 clusters (138 singlets and 111 contigs), with a novelty index of 32.8%. Several genes that were up- or down-regulated exclusively in the stressed or control conditions were identified. Thirteen differentially expressed candidate genes related to abiotic stress were selected for further validation through RT-qPCR. This is, to date, the first report on the analysis of wild *Arachis* transcriptome under abiotic stress. The information produced in this study is a valuable resource for gene discovery, characterization of new wild alleles, and molecular markers development.

Keywords: *Arachis*; drought; SSH; EST.

Introdução

A identificação de genes envolvidos com a tolerância ao estresse hídrico tem sido uma das ações de pesquisa de maior interesse para programas de melhoramento genético de plantas em todo mundo. Pesquisas aplicadas à prospecção de genes envolvidos com estresse abiótico estão sendo desenvolvidas para uma série de espécies vegetais (TUBEROSA e SALVI, 2006; VALLIYODAN e NGUYEN, 2006). Não obstante o esforço, a correlação entre os genes, e sua regulação, com a tolerância à seca permanece indeterminado (SREENIVASULU et al., 2007; VIJ e TYAGI, 2007). De fato, apesar dos inúmeros estudos, inexistem aplicações biotecnológicas que resolvam o problema. A introdução de genes únicos em plantas transgênicas, por exemplo, confere variáveis graus de resistência/tolerância, mas com inúmeros efeitos para o desenvolvimento da planta, inviabilizando sua aplicação econômica (DENBY e GEHRING, 2005; BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007). Isto se deve à complexidade da resposta das plantas em face de situações de estresse e indica que a abordagem deve ser holística, com a análise de diversos componentes moleculares e celulares simultaneamente para que se tenha melhor entendimento dos processos.

Assim, a identificação de genes expressos pela planta em resposta aos diferentes tipos de estresse é um dos passos críticos que leva à elucidação dos mecanismos de tolerância à seca. Até recentemente, a análise da expressão dos genes limitava-se ao estudo de um gene de cada vez. Atualmente, os avanços nas tecnologias em larga escala de sequenciamento e de análise do transcrito por arranjos de DNA possibilitaram o estudo simultâneo da expressão e da regulação de genes em diferentes processos biológicos. Além disso, esses dados nos permitem realizar comparações entre espécies, revelando importantes informações sobre estrutura de genomas e mecanismos de evolução, divergência e domesticação (BARRERO et al., 2006; CUI et al., 2006; SAMPEDRO et al., 2006).

A prospecção de genes relacionados a estresses abióticos encontra-se em estágio avançado para espécies-modelo como *Arabidopsis thaliana* e arroz (*Oryza sativa*), devido à disponibilidade das suas sequências genômicas completas e ao tamanho reduzido de seus genomas, além da facilidade de transformação genética. A situação para outras espécies, como o amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*), não é tão vantajosa no aspecto molecular, devido a diversos fatores intrínsecos a esta espécie como poliploidia, genoma relativamente grande e abundância de sequências repetitivas. Existem também poucos dados de sequências para o gênero *Arachis*, tendo aproximadamente 92.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>). A prospecção e o estudo de genes de interesse agrônomico ainda são bastante limitados para amendoim, embora alguns genes relacionados à resposta ao estresse hídrico já tenham sido identificados para a espécie cultivada (*A. hypogaea*) (LUO et al., 2005b; WAN e LI, 2005; GUO et al., 2006; DRAMÉ et al., 2007; SENTHIL-KUMAR et al., 2007).

Grande parte da dificuldade encontrada para o mapeamento de genes de interesse em *A. hypogaea* é devida à sua origem, resultante da hibridização de duas espécies silvestres

diplóides (uma contendo genoma do tipo AA e outra contendo genoma do tipo BB), que produziu um híbrido estéril, cuja fertilidade foi recuperada através de uma rara e espontânea duplicação de cromossomos (SIMPSON, 2001). O tetraplóide (AABB) resultante tinha vigor híbrido, mas era geneticamente isolado dos parentes silvestres em decorrência da diferença entre ploidias. Este isolamento criou um gargalo genético severo, resultando em uma cultura com baixa diversidade, limitando diversos aspectos do melhoramento, como produtividade e produção de variedades resistentes aos diferentes estresses (RAINA et al., 2001).

As espécies silvestres do gênero *Arachis* são, por outro lado, mais diversas geneticamente, e foram selecionadas, ao longo da evolução, na presença de diversas pragas e em uma variedade de ambientes, apresentando, portanto, uma grande amplitude de resistências aos estresses bióticos e abióticos. Sendo assim, o *pool* gênico *Arachis* pode oferecer rica e inexplorada fonte de genes relacionados com a adaptação a condições adversas, que pode ser utilizada para o melhoramento do próprio amendoim e de outras culturas e bem como para o melhor entendimento dos fenômenos biológicos de resposta a estresses (MORETZSOHN et al., 2005; LEAL-BERTIOLI et al., 2007; PROITE et al., 2007; ALVES et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo a construção, validação e análise de duas bibliotecas subtrativas de cDNA obtido de folhas da espécie silvestre *Arachis magna* submetida a estresse hídrico gradual. Essa análise do transcrito visa a prospecção de genes associados à resposta à seca. Germoplasma silvestre constitui excelente fonte de genes de tolerância, que podem ser identificados e isolados para serem utilizados como marcadores moleculares em programas de seleção assistida ou serem introgrididos/introduzidos em espécies cultivadas, oferecendo importantes alternativas para o desenvolvimento de novas variedades mais adaptadas a condições ambientais adversas.

Material e Métodos

1. Ensaio de desidratação gradual e controlada (tipo *dry down*) com plantas de *Arachis magna*

Sementes de *A. magna* (acesso KG30097), uma espécie silvestre de genoma diplóide do tipo BB, foram germinadas em vasos plásticos, perfurados na parte inferior em telado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - DF). O ensaio de desidratação gradual e controlada (*dry down*) iniciou-se 150 dias após a germinação, no período de 16 a 30 de Julho de 2007, utilizando o método descrito por Sinclair e Ludlow (1986). As plantas foram divididas em dois grupos (controle e estressado), com 16 plantas cada: grupo controle (irrigado regularmente) e grupo estressado (submetido à desidratação gradual). Os grupos foram compostos por indivíduos em estágio de crescimento similar (Figura 1), com plantas menores (apenas com eixo central) e maiores (com eixo central e ramos laterais desenvolvidos) distribuídas proporcionalmente nos grupos.

Os vasos foram então cobertos com saco plástico transparente amarrado com barbante na coroa da planta, para que a evaporação ocorresse somente pela parte aérea (Figura 1). As

plantas foram mantidas em câmara fechada de acrílico em um telado, visando diminuir os efeitos de vento, umidade, incidência solar e variação de temperatura (Figura 1).

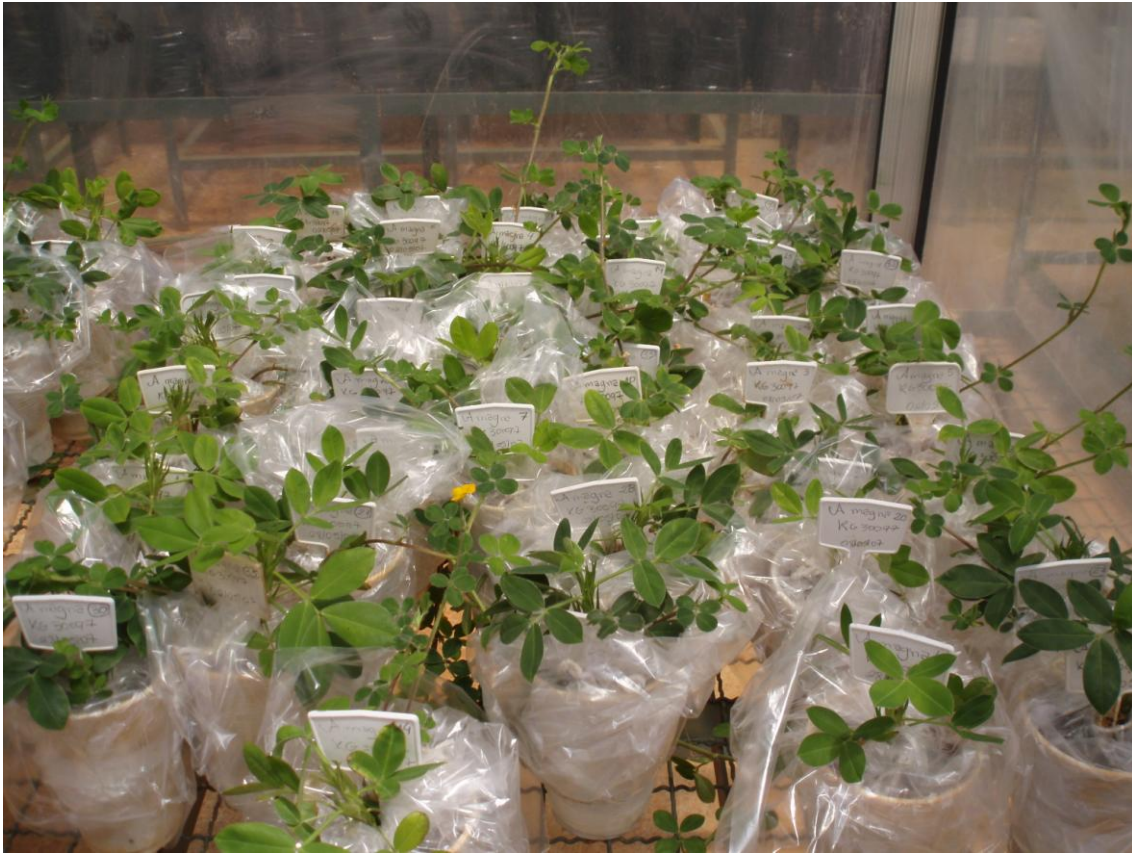


Figura 1. Plantas de *A. magna* (acesso KG30097) com 150 dias após a germinação, no primeiro dia do ensaio de desidratação gradual e controlada (*dry down*). Os vasos estão cobertos com saco plástico, deixando somente a parte aérea descoberta, e dentro de uma câmara fechada de acrílico.

Medidas gravimétricas foram realizadas pela manhã ao longo do ensaio para estimar a taxa de transpiração diária individual (expressa em gramas) nos dois grupos de plantas (controle e estressado). A taxa de transpiração estimada corresponde ao peso do dia anterior (expresso em gramas) somado ao volume de água adicionada no dia anterior (expresso em mililitros) diminuído do peso do dia (expresso em gramas). A partir da taxa de transpiração estimada, calculou-se a Taxa de Transpiração Normalizada (NTR, *Normalized Transpiration Ratio*) individual que é a razão normalizada entre a taxa de transpiração de cada planta estressada e a média da taxa de transpiração das plantas-controle naquele dia.

O grupo de plantas-controle foi reidratado diariamente após a pesagem de forma a manter sua capacidade de campo (CC) em torno de 90% ao longo do ensaio. Para tanto, a quantidade de água a ser acrescentada em cada planta foi calculada como a média da taxa de transpiração diária das plantas-controle, expressa em mililitros. Em paralelo, o grupo de plantas estressadas foi submetido a desidratação gradual, isto é, não se adicionou água a este grupo ao longo do ensaio.

As NTRs calculadas diariamente determinaram os pontos de coleta do ensaio. A coleta de amostras foi realizada no dia em que a NTR sugeria uma alteração no padrão de transpiração das plantas submetidas à desidratação gradual em relação às plantas-controle mantidas em CC. Em cada ponto de coleta estabelecido, folhas de oito plantas-controle e

de oito plantas estressadas foram coletadas, identificadas e congeladas imediatamente no nitrogênio líquido. O material vegetal foi armazenado a - 80°C para posterior extração de RNA total.

2. Extração de RNA total de folhas de *A. magna*

Seis diferentes protocolos foram testados para se determinar qual seria o melhor para extração de RNA total de folhas de *A. magna*, levando em consideração o rendimento e a qualidade do RNA obtido. Quatro desses protocolos são baseados na utilização de sais de guanidina, como os reagentes: (i) TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA; CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006); (ii) *Concert™ Plant RNA* (Invitrogen, Carlsbad, EUA); (iii) Brazol (LGC Biotecnologia Ltda., São Paulo, Brasil); e (iv) Tri-Phasis (Bio-Agency, São Paulo, Brasil). O quinto protocolo testado foi o do kit *illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). O sexto protocolo é baseado na metodologia de extração com fenol e cloreto de lítio (LiCl, BEZERRA, 1998). Entre esses, o método abaixo descrito, utilizando o reagente TRIzol®, foi o que apresentou melhores resultados.

O RNA foi extraído segundo protocolo fornecido pelo fabricante, com modificações. Folhas (250 mg) foram pesadas e maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. O material macerado foi transferido para tubo do tipo Falcon de 15 mL, previamente resfriados em nitrogênio líquido, e 2,5 mL de TRIzol® Reagent foram adicionados ao pó, seguido de imediata homogeneização. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. A etapa de centrifugação foi repetida e a fase aquosa novamente transferida. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e 500 µL de clorofórmio foram adicionados a cada amostra, seguido de homogeneização por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 12 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C, 500 µL da fase aquosa foram cuidadosamente transferidos para um tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL e 300 µL de isopropanol e 300 µL de solução salina (citrato de sódio 0,8 M e NaCl 1,2 M) foram adicionados. Após agitação manual para homogeneização, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% (v/v) foi adicionado a cada amostra e o precipitado lavado por agitação manual. Após centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Nova centrifugação a 3.000 rpm por 5 segundos a temperatura ambiente foi realizada para precipitar qualquer resíduo de etanol que tivesse ficado aderido ao tubo. Retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta e o precipitado foi seco a temperatura ambiente por 5 minutos e ressuscitado em 10 a 50 µL de água livre de RNase. Para acelerar a ressuspensão, as amostras foram incubadas em banho seco a 55°C por 10 minutos e imediatamente incubadas em gelo. O RNA total isolado foi armazenado a -80°C.

3. Análise quantitativa e qualitativa do RNA total isolado

A avaliação qualitativa da integridade do RNA total extraído foi realizada pela análise por eletroforese de 5 µL de cada amostra em gel de agarose 1,5% (p/v), não-desnaturante,

corado com brometo de etídio, com tampão de corrida TAE (Tris-Acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 8,3) e voltagem de 60 V, por aproximadamente 35 minutos.

A avaliação quantitativa da concentração e pureza do RNA total foi realizada por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

4. Construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA de folhas de *A. magna* submetidas a estresse hídrico

A partir de 3 mg de RNA total extraído de folhas de *A. magna* submetidas a desidratação gradual e seu respectivo controle mantido em CC, o RNA mensageiro (mRNA) foi purificado com o kit Oligotex® (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo o protocolo do fabricante (Oligotex mRNA Batch Protocol). Aproximadamente 2 µg de mRNA purificado de cada tratamento (estressado e controle) foram utilizados para a construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA do tipo SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), conforme instruções do fabricante (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, Clontech, Mountain View, EUA).

Os cDNAs amplificados após a subtração foram clonados no vetor pGEMTeasy, segundo as instruções do fabricante (pGEM®-T Easy Vector System, Promega, Madison, EUA), e introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, Carlsbad, EUA) por eletroporação, segundo o protocolo descrito por Aragão e Rech (1998). As colônias bacterianas que cresceram em meio sólido LB (MILLER, 1972) contendo o agente seletivo ampicilina (100 mg/L) foram selecionadas e repicadas em novas placas contendo o mesmo meio de crescimento.

5. Sequenciamento e análise computacional dos ESTs

A miniextração de DNA plasmidial em placas de 96 poços dos clones bacterianos selecionados e o sequenciamento das extremidades 5' desses clones de cDNA foram realizados segundo os protocolos descritos pela Plataforma de Sequenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/servicos.html>). Para o sequenciamento, utilizaram-se os iniciadores *forward* e *reverse* que flanqueiam os cDNAs amplificados, conforme o manual do PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Mountain View, EUA).

Os eletroferogramas gerados no sequenciamento dos clones de cDNA foram analisados através de bioinformática. Primeiramente, um controle de qualidade das sequências foi feito pelo programa Phred (EWING et al., 1998). Para esta análise, parâmetros de aceitação de sequências foram estabelecidos conforme Telles e Silva (2001), com qualidade Phred superior a 20 e tamanho mínimo de 100 pb. A remoção de sequências ribossomais, de cauda poli-(A), de sequências de baixa qualidade, de regiões do vetor e de adaptadores, foi conduzida conforme Telles e Silva (2001).

As sequências de alta qualidade foram submetidas à montagem utilizando o programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999). As sequências consenso foram comparadas com as existentes em bancos de dados GenBank *nr* (BENSON et al., 2008) através da ferramenta BLASTx (*Basic Local Alignment Search Tool*; ALTSCHUL et al., 1990) e utilizadas para a

criação de um banco de dados local. As sequências com similaridade às daquelas de genes relacionados à resposta aos estresses biótico e abiótico foram selecionadas.

Resultados e Discussão

1. Ensaio de desidratação gradual e controlada (tipo *dry down*) com plantas de *Arachis magna*

Durante os quinze dias de ensaio, a resposta à desidratação gradual de cada planta foi acompanhada diariamente através da determinação da perda diária de peso das plantas para estimar a taxa de transpiração individual. A NTR (transpiração normalizada) diária individual foi calculada como a relação entre a taxa de transpiração de cada planta estressada e a média da transpiração plantas-controle. A NTR é um parâmetro que visa minimizar as variações entre as plantas e as variações devidas aos efeitos ambientais, através da normalização (RAY e SINCLAIR, 1998).

A coleta das amostras (folhas) foi realizada em dois pontos (aos 10º e 15º dias após o início do ensaio), quando se observou alteração no padrão de transpiração das plantas estressadas em relação às plantas-controle. A média da NTR individual das plantas nestes dois pontos foi de $0,744 \pm 0,374$. As coletas com NTRs individuais variando de 1,12 a 0,37 visam cobrir desde o estágio inicial (estágio I) até o estágio II de uma curva típica de transpiração NTR x FTSW (*Fraction of Transpirable Soil Water*), descrita por Sinclair e Ludlow (1986). Nos dois pontos de coleta deste ensaio, consideramos no estágio I as plantas que apresentaram NTR individual acima de 0,6 (oito plantas estressadas no total) e no estágio II aquelas com NTR individual entre 0,2 e 0,6 (sete plantas estressadas no total). A relação entre esses valores de NTR e a curva de transpiração NTR x FTSW foi previamente determinada por nossa equipe para 18 diferentes acessos silvestres de *Arachis*, incluindo *A. magna* (LEAL-BERTIOLI et al., 2007).

Segundo Sinclair e Ludlow (1986), no estágio I, as plantas submetidas a estresse gradual ainda transpiram pelo menos 40% em relação às plantas-controle em 90% de CC (*well-watered*). Nesse estágio I, a água disponível no solo é alta e as raízes ainda são capazes de suprir água necessária para as folhas transpirem. No estágio II, há um rápido declínio na taxa de transpiração quando a água disponível no solo diminuiu e as raízes perdem a capacidade de suprir de maneira adequada a água para as folhas transpirem, caracterizando assim o estresse hídrico.

Como observado em estudo anterior (LEAL-BERTIOLI et al., 2007), as plantas de *A. magna* apresentaram alta adaptação sob as condições de estresse hídrico durante o ensaio, mostrando mesma longevidade, aspecto anatomo-morfológico foliar saudável e aparência similar a de plantas irrigadas regularmente, apesar de estar sob condições de estresse hídrico (Figura 2).



Figura 2. Plantas de *A. magna* (acesso KG30097), dez dias após o início do ensaio (primeiro ponto de coleta). Direita: planta-control, irrigada regularmente. Esquerda: planta estressada, submetida à desidratação gradual.

2. Estabelecimento do protocolo de extração de RNA total para folhas de *A. magna*

Seis diferentes metodologias foram testadas para determinar o melhor protocolo para extração de RNA total de folhas de *A. magna*, visto que não havia protocolo publicado para esta espécie. Quatro desses protocolos utilizam agentes desnaturantes fortes, como soluções monofásicas de sais de guanidina e fenol (reagentes TRIzol®; Concert™ Plant RNA; Brazol e Tri-Phasis). Esses protocolos combinam as propriedades do fenol e dos sais de guanidina, que inibem imediata e efetivamente a atividade da enzima RNase. As células presentes na amostra biológica são rompidas/lisadas por esses reagentes e, após homogeneização, adição de clorofórmio e posterior centrifugação, o produto resultante é separado em duas fases. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Estas metodologias baseadas em sais de guanidina têm se mostrado altamente eficazes na purificação de RNA a partir de diferentes materiais vegetais (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006). O quinto protocolo testado foi o do kit para isolamento de *RNA illustra RNAspin*. O sexto protocolo testado foi extração com fenol, seguida de uma separação de RNA do DNA por precipitação seletiva, usando LiCl. Metodologias baseadas na extração por LiCl são amplamente utilizadas para a extração de RNA total de plantas, obtendo, de maneira geral, um excelente rendimento (BEZERRA, 1998).

Dentre os protocolos testados, a metodologia utilizando o reagente TRIzol®, embora mais oneroso, foi a que obteve o RNA total com melhor qualidade (sem contaminação com DNA e outras impurezas) para folhas de *A. magna* (Figuras 3a e 3b). Os demais métodos apresentaram contaminação com DNA ou baixa eficiência (Figuras 3a, 3c e 3d). A

integridade do RNA total extraído pôde ser avaliada em gel de agarose, onde duas bandas mais fortes correspondentes ao RNA ribossomal (28S e 18S) eram claramente visíveis e sem contaminação com DNA (Figura 3).

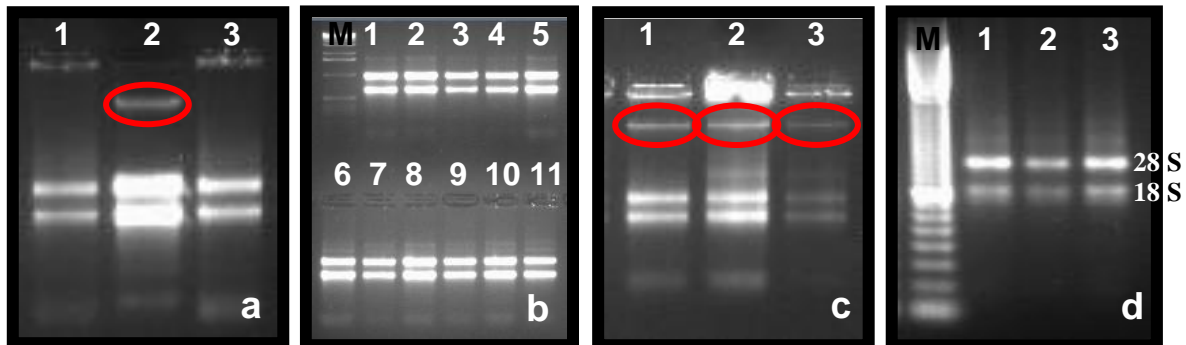


Figura 3. Gel de agarose 1,5% (p/v) em TAE, corado com brometo de etídio, contendo amostras de RNA total extraído de folha de *A. magna*: (a) Poços 1 e 3 - RNA extraído com TRIzol®; poço 2 - RNA extraído com o protocolo de LiCl, apresentando contaminação com DNA; (b) Poços 1 a 11 - RNA extraído com TRIzol®; (c) Poços 1 a 3 - RNA extraído com Brazol, apresentando contaminação com DNA e (d) Poços 1 a 3 - RNA extraído com Tri-Phasis. A contaminação com DNA está em destaque (círculo vermelho) nos géis a e c. As duas bandas de RNA claramente visíveis nos géis são os RNAs ribossomais (28S e 18S), que representam a maior população de RNA em plantas.

3. Qualidade do RNA total isolado de folhas de *A. magna*

Existem poucos trabalhos que descrevem o isolamento de RNA em espécies de *Arachis*. A maioria está relacionada ao isolamento de RNA total da espécie cultivada *A. hypogaea* (JAIN et al., 2001; JAIN, 2004; LUO et al., 2005a, 2005b; BHATNAGAR-MATHUR et al., 2007; DEVAIAH et al., 2007, entre outros) e apenas um trabalho, realizado por nossa equipe, com uma espécie silvestre, *A. stenosperma* (PROITE et al., 2007). Esses trabalhos utilizaram o método baseado na utilização do TRIzol® ou kits para o isolamento do RNA. No presente trabalho, o protocolo original de extração de RNA total com TRIzol®, fornecido pelo fabricante, sofreu alguns ajustes para se adequar ao material vegetal silvestre utilizado, tais como, a adição de uma solução altamente salina durante a precipitação com isopropanol para eliminação de polissacarídeos e centrifugações adicionais para melhor limpeza do material.

Nas amostras de folhas de *A. magna*, houve dificuldade para ressuspensão do precipitado de RNA total em água, possivelmente pela alta concentração de polissacarídeos que podem ter se agrupado ao RNA e co-precipitado, tornando a amostra excessivamente viscosa. Essa mesma viscosidade, devida à contaminação por polissacarídeos, já foi descrita em outras espécies de plantas, como *Cinnamomum tenuipilum* (ZENG e YANG, 2002), maçã (GASIC et al., 2004), *Dendrobium nobile* (LI et al., 2006), *Hibiscus tiliaceus* (YANG et al., 2008), entre outras.

Após corrida em gel de agarose não-desnaturante, as amostras de RNA extraídas que apresentaram características indesejáveis, tais como rendimento abaixo da média, contaminação com polissacarídeos ou outros contaminantes, presença de DNA ou degradação, foram novamente extraídas. Após a verificação da qualidade, as amostras foram quantificadas em espectrômetro. Em média, um baixo rendimento (menos que 100 µg de RNA total extraído por 250 mg de material vegetal macerado) na extração de RNA

total foi observado, principalmente para amostras submetidas ao estresse hídrico em comparação com as plantas-controle.

4. Análise das sequências

A fim de se identificar os fatores moleculares envolvidos na resposta de *A. magna* ao estresse hídrico, duas bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de folhas de plantas submetidas à desidratação gradual e plantas-controle mantidas em capacidade de campo. Na primeira biblioteca (AM1eh-c), cDNAs de folhas de plantas submetidas a desidratação gradual (cDNA *tester*) foram subtraídas dos cDNAs de folhas das plantas-controle (cDNA *driver*). Dessa biblioteca, 611 clones foram selecionados para sequenciamento. Na segunda biblioteca (AM2c-eh), cDNAs de folhas de plantas-controle foram utilizados como cDNA *tester* para subtração dos cDNAs de folhas de plantas submetidas a uma desidratação gradual, como cDNA *driver*. Dessa biblioteca, 965 clones foram selecionados para sequenciamento.

No total, 1.576 clones das duas bibliotecas foram sequenciados, dos quais 759 sequências (48,2%) foram aproveitadas após análise de qualidade, formando um total de 249 *clusters*, sendo 225 da biblioteca AM1eh-c e 38 da biblioteca AM2c-eh. Dos 249 *clusters*, foram obtidos 138 *singlets* (sequências únicas) e 111 *contigs* (agrupamentos), com um índice de novidade de 32,8%. A Tabela 1 mostra um sumário do número clones sequenciados e montagem dos clones em *contigs* ou *singlets* das duas bibliotecas de folha de *A. magna*.

Tabela 1: Sumário do número de clones sequenciados e montagem dos clones das bibliotecas de folha de *Arachis magna* submetidas a estresse hídrico.

| Bibliotecas | Número de clones | Número de <i>clusters</i> | <i>Singlets</i> | <i>Contigs</i> | Índice de novidade % |
|-------------------------------|------------------|---------------------------|-----------------|----------------|----------------------|
| AM1eh-c | 586 | 225 | 128 | 97 | 38,39 |
| AM2c-eh | 173 | 38 | 17 | 21 | 21,96 |
| AM1eh-c + AM2c-eh (juntas) | 759 | 249 | 138 | 111 | 32,80 |

O programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999) permitiu agrupar sequências similares e, para cada biblioteca, visualizar a frequência de distribuição das sequências agrupadas (número de leituras x número de *clusters*, Figuras 4, 5 e 6)

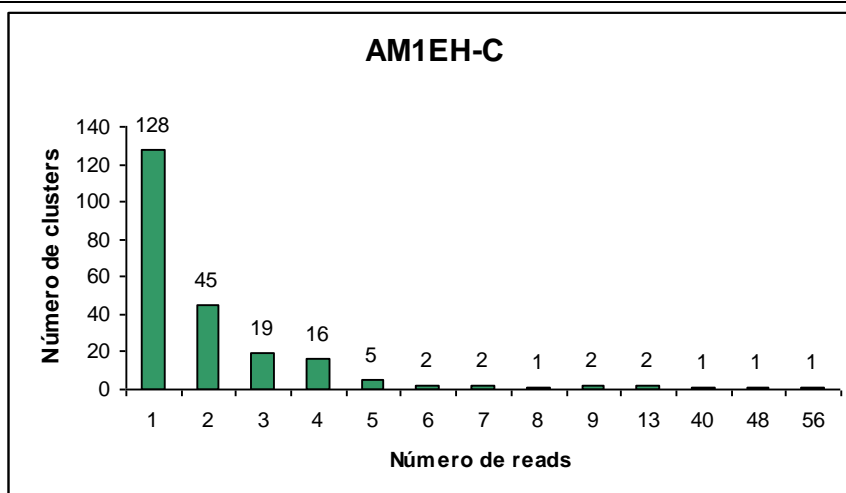


Figura 4. Frequência de distribuição das seqüências da biblioteca AM1eh-c agrupadas mediante o uso da ferramenta CAP3.

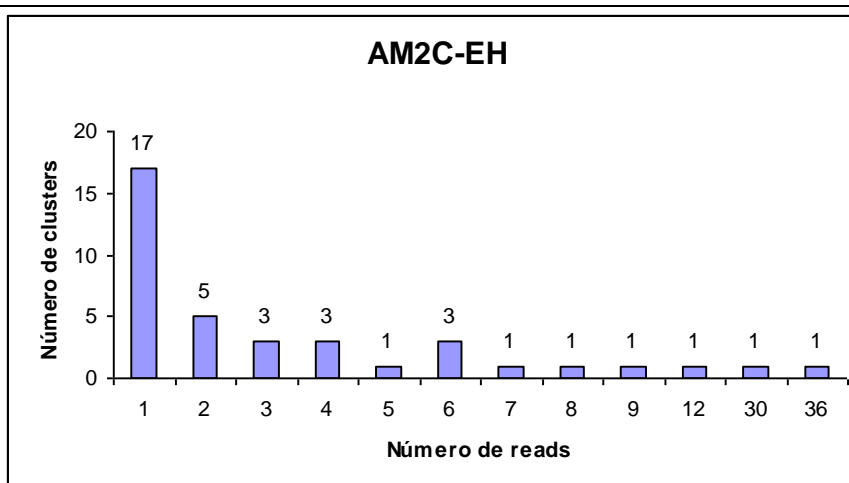


Figura 5. Frequência de distribuição das seqüências da biblioteca AM2c-eh agrupadas mediante o uso da ferramenta CAP3.

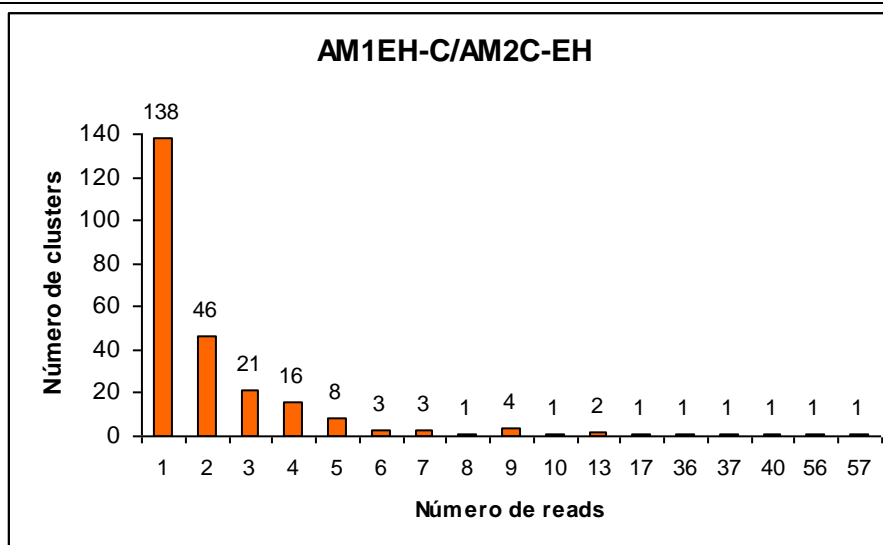


Figura 6: Frequência de distribuição das seqüências da biblioteca AM1EH-C/AM2C-EH agrupadas mediante o uso da ferramenta CAP3.

5. Sequências diferencialmente expressas

Através da busca de similaridade entre as sequências de cDNA das bibliotecas AM1eh-c e AM2c-eh de folhas de *A. magna* submetidas ao estresse hídrico e as sequências protéicas depositadas no banco de dados Genbank (nr), foi possível prever a função de algumas dessas sequências. Esta estratégia de busca permitiu a identificação de clones com sequências similares a de genes relacionados com resistência a estresse biótico e abiótico. A análise *in silico* das sequências também permitiu a comparação dos genes expressos nas duas bibliotecas, sendo alguns expressos exclusivamente na biblioteca AM1eh-c e outros exclusivamente na biblioteca AM2c-eh. Desses, as 13 sequências que apresentaram as expressões diferenciais mais significativas pelo Teste Exato de Fisher e que estão relacionadas à resposta aos estresses biótico e abiótico foram consideradas como genes-candidatos para posterior validação da expressão diferencial, tais como *disease resistance protein* (Figura 7), *drought induced protein* e catalase.

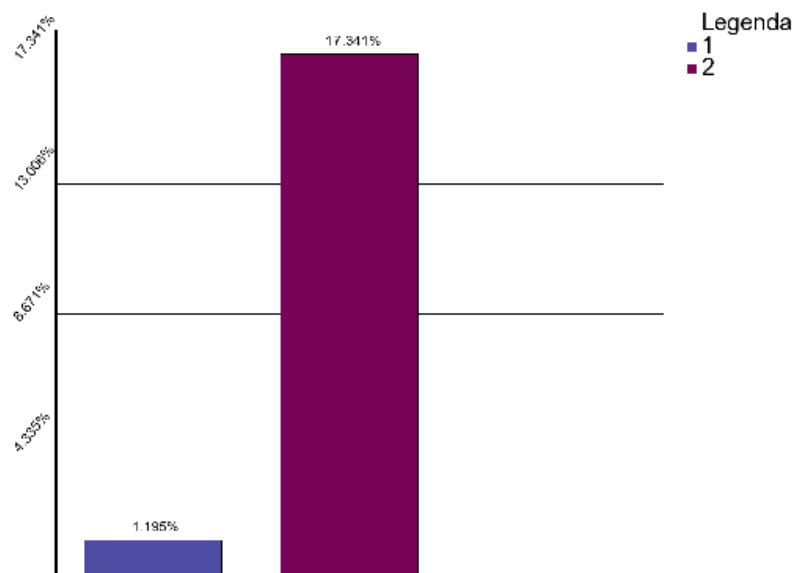


Figura 7. *Disease resistance protein* preferencialmente expressa na biblioteca AM2c-eh (■) em relação à biblioteca AM1eh-c (■). Dado obtido através do Teste Exato de Fisher.

Utilizando as informações geradas nessas duas bibliotecas subtrativas, os genes-candidatos estão sendo validados através de macroarranjos de DNA e pela tecnologia da RT-qPCR em tempo real. Além disso, marcadores moleculares do tipo SSR e SNPs estão sendo desenvolvidos a partir de todas as seqüências e os mesmos serão utilizados nos mapas genéticos de *Arachis*. Os marcadores moleculares desenvolvidos poderão ser utilizados em programas de seleção assistida. Genes-candidatos diferencialmente expressos podem ser isolados através de bibliotecas BAC (GUIMARÃES et al., 2008) e introgridos em espécies cultivadas, oferecendo importantes alternativas para o desenvolvimento de novas variedades de amendoim, ou de outras culturas, mais adaptadas a condições ambientais adversas.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. W.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, D. M. T.; PEREIRA, R. W.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; MORETZSOHN, M. C.; GUIMARAES, P. M.; BERTIOLI, D. J. Development and use of single nucleotide polymorphism markers for candidate resistance genes in wild peanuts (*Arachis* spp). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, SP, v. 7, p. 631-642, 2008.
- ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Isolamento de vetores para transformação direta. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-Cenargen, 1998. p. 17-33.
- BARRERO, L. S.; CONG, B.; WU, F.; TANKSLEY, S. D. Developmental characterization of the fasciated locus and mapping of *Arabidopsis* candidate genes involved in the control of floral meristem size and carpel number in tomato. **Genome**, Ottawa, CA, v. 49, n. 8, p. 991-1006, 2006.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 36, n. Database, p. D25-D30, 2008.
- BEZERRA, I. C. Análise de RNA pela técnica northern blot. In: In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-Cenargen, 1998. p. 223-238.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, J. M.; LAYANYA, M.; REDDY, D.; VADEZ, V.; SERRAJ, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHARMA, K. K. Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 26, p. 2071-2082, 2007.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, p. 581-585, 2006.
- CUI, L.; WALL, P. K.; LEEBENS-MACK, J. H.; LINDSAY, B. G.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J.; SOLTIS, P. S.; CARLSON, J. E.; ARUMUGANATHAN, K.; BARAKAT, A.; ALBERT, V. A.; MA, H.; DE PAMPILIS, C. W. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, US, v. 16, n. 6, p. 738-749, 2006.
- DENBY, K.; GEHRING, C. Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in *Arabidopsis*. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 23, n. 11, p. 547-552, 2005.
- DEVAIAH, K. M.; BALI, G.; ATHMARAM, T. N.; BASHA, M. S. Identification of two new genes from drought tolerant peanut up-regulated in response to drought. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, NL, v. 52, p. 249-258, 2007.
- DRAMÉ, K. N.; CLAVEL, D.; REPELLIN, A.; PASSAGUE, C.; ZUILY-FODIL, Y. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, n. 3-4, p. 236-243, 2007.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, US, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. RNA Extraction from different apple tissues rich in polyphenols e polysaccharides for cDNA Library Construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, GR, v. 22, p. 437a-437g, 2004.

GUIMARÃES, P. M.; GARSMEUR, O.; PROITE, K.; LEAL BERTIOLI, S. C. M.; SEIJO, G.; CHAINE, C.; BERTIOLI, D.; D'HONT, A. BAC libraries construction from the ancestral diploid genomes of the allotetraploid cultivated peanut. **BMC Plant Biology**, v.8, n.14, 2008.

GUO, B. Z.; XU, G.; CAO, Y. G.; HOLBROOK, C. C.; LYNCH, R. E. Identification and characterization of phospholipase D and its association with drought susceptibilities in peanut (*Arachis hypogaea*). **Planta**, Berlin, DE, v. 223, n. 3, p. 512-520, 2006.

HUANG, X. Q.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, US, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

JAIN, A. K. Cloning and structural analysis of a cDNA clone encoding glycinin (Gly-1) seed storage protein of peanut. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v. 7, n. 3, p. 11, 2004.

JAIN, A. K.; BASHA, S. M.; HOLBROOK, C. C. Identification of drought-responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v. 4, p. 59 -67, 2001.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; VADEZ, V.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, P. I. T.; MORAES, L. F. M. V.; BERTIOLI, D. J.; ARAÚJO, A. C. G. **Avaliação de espécies silvestres de Arachis, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 166).

LI, B.; WANG, B. C.; TANG, K.; LIANG, Y. L.; WANG, J.; WEI, J. M. A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, Amsterdam, NL, v. 49, p. 101-105, 2006.

LUO, M.; DANG, P.; BAUSHER, M. G.; HOLBROOK, C. C.; LEE, R. D.; LYNCH, R. E.; GUO, B. Z. Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut (*Arachis hypogaea*). **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 95, p. 381-387, 2005a.

LUO, M.; LIANG, X. Q.; DANG, P.; HOLBROOK, C. C.; BAUSHER, M. G.; LEE, R. D.; GUO, B. Z. Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 169, n. 4, p. 695-703, 2005b.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

MORETZSOHN, M. C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARAES, P. M.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GIMENES, M. A.; MARTINS, W. S.; VALLS, J. F. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTIOLI, D. J. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 111, p. 1060-1071, 2005.

- PROITE, K.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; MORETSZOHN, M. C.; SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; GUIMARÃES, P. M. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. **BMC Plant Biology (Online)**, v. 7, p. 215-225, 2007. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-7-7.pdf> >. Acesso em: 2008.
- RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, Ottawa, CA, v. 44, p. 763-772, 2001.
- RAY, J. D.; SINCLAIR, T. R. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, GB, v. 49, n. 325, p. 1381-1386, 1998.
- SAMPEDRO, J.; CAREY, R. E.; COSGROVE, D. J. Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. **Journal of Plant Research**, Tokyo, JP, v. 119, n. 1, p. 11-21, 2006.
- SENTHIL-KUMAR, M.; GOVIND, G.; KANG, L.; MYSORE, K. S.; UDAYAKUMAR, M. Functional characterization of *Nicotiana benthamiana* homologs of peanut water deficit-induced genes by virus-induced gene silencing. **Planta**, Berlin, DE, v. 225, p. 523-539, 2007.
- SIMPSON, C. E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *Arachis hypogaea*. **Peanut Science**, Raleigh, US, v. 28, p. 114-116, 2001.
- SINCLAIR, T. R.; LUDLOW, M. M. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, AU, v. 13, n. 3, p. 329-341, 1986.
- SREENIVASULU, N.; SOPORY, S. K.; KAVI KISHOR, P. B. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene**, Amsterdam, NL, v. 388, n. 1-2, p. 1-13, 2007.
- TELLES, G. P.; SILVA, F. R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 24, n. 1-4, p. 17-23, 2001.
- TUBEROSA, R.; SALVI, S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. **Trends in Plant Science**, Oxford, GB, v. 11, n. 8, p. 405-412, 2006.
- VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, US, v. 9, n. 2, p. 189-95, 2006.
- VIJ, S.; TYAGI, A. K. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, GB, v. 5, n. 3, p. 361-380, 2007.
- WAN, X.; LI, L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. **DNA Sequence: the Journal of DNA Sequencing and Mapping**, v. 16, n. 3, p. 217-223, 2005.
- YANG, G.; ZHOU, R.; TANG, T.; SHI, S. Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from *Hibiscus tiliaceus*, a mangrove associate and its relatives. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 257-264, 2008.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA Isolation From highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, GR, v. 20, p. 417a–417e, 2002.